

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie (Fyziologie buňky)



Bc. Jakub Gemperle

Hledání nových interakčních partnerů SH3 domény adaptorového proteinu p130Cas

The search for novel interaction partners of SH3 domain of an adaptor protein p130Cas

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Daniel Rösel, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 07. 05. 2012

.....

Bc. Jakub Gemperle

Poděkování patří mému školiteli RNDr. Danielu Röselovi, Ph.D. za věcné rady a cenné připomínky při psaní této práce.

Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Radoslavu Janoštiakovi za pomoc při konfokální mikroskopii a ostatním kolegům z laboratoře za vytvoření příjemného prostředí při experimentech.

Abstrakt a klíčová slova:

Protein p130Cas patří mezi hlavní tyrosin-fosforylované proteiny v buňkách transformovaných onkogeny *v-crk* a *v-src*. Jeho exprese je nezbytná pro invazivitu a tvorbu metastáz v buňkách transformovaných aktivovanou kinázou Src. Vysoké hladiny exprese proteinu p130Cas u pacientů s rakovinou prsu jsou spojeny s větším rizikem návratu choroby, slabou odpovědí na léčbu tamoxifenem a horší prognózou. V netransformovaných buňkách je p130Cas fosforylován v substrátové doméně po stimulaci integrinů, což ovlivňuje buněčnou migraci a dynamiku cytoskeletu. Na této signalizaci se nepostradatelně podílí právě SH3 doména p130Cas. V této diplomové práci jsme jako první analyzovali pomocí metody Phage display a následně charakterizovali vazebný motiv SH3 domény p130Cas. Na základě tohoto vysokoafinitního motivu [AP]-P-[APMS]-K-P-[LPST]-[LR]-[LPST] jsme predikovali nové interakční partnery proteinu p130Cas a následně potvrdili interakci se Ser/Thr kinázou PKN3. Tato kináza kolokalizuje s p130Cas v jádře a perinukleární oblasti a mohla by p130Cas fosforylovat. V rámci této diplomové práce jsme také analyzovali vliv fosfomimikující mutace tyrosinu ze sekvence ALYD, která je konzervovaná v sekvenci SH3 domén, na schopnost těchto domén vázat ligandy. Tato mutace snižovala vazbu asi o 3 řády jak k ligandům I. třídy (SH3 domény Src), tak ligandům II. třídy (SH3 domény p130Cas).

Klíčová slova

p130Cas, Src, SH3 doména, fosfomimikující mutace, Phage display

Abstract and keywords:

Protein p130Cas is the major tyrosine phosphorylated protein in cells transformed by *v-crk* and *v-src* oncogenes. P130Cas plays an important role in invasiveness and metastasis of Src-transformed cells. In breast cancer patients, high p130Cas levels are associated with higher recurrence of disease, poor response to tamoxifen treatment and lower overall survival. In non-transformed cells, after the stimulation of integrins, protein p130Cas is phosphorylated in substrate domain affecting cell migration and cytoskeletal dynamics. For this signalling is the SH3 domain of p130Cas indispensable. In this thesis, was for the first time using the Phage display method analysed and subsequently characterized the binding motif of SH3 domain of p130Cas. Based on this high-affinity motif [AP]-P-[APMS]-K-P-[LPST]-[LR]-[LPST], we predicted new interaction partners of protein p130Cas and subsequently confirmed the interaction with the Ser/Thr kinase PKN3. This kinase colocalizes with p130Cas in the nucleus and perinuclear region and could phosphorylate p130Cas. In this thesis, we also analysed the effect of phosphomimicking mutation of tyrosine from sequence ALYD, which is conserved in the sequence of SH3 domains, on ability of these domains to bind ligands. This mutation reduced binding by about 3 orders of magnitude to both type of ligands – class I (Src SH3 domain) and class II (p130Cas SH3 domain).

Keywords

p130Cas, Src, SH3 domain, phosphomimic mutation, Phage display

OBSAH:

ABSTRAKT A KLÍČOVÁ SLOVA:	1
ABSTRACT AND KEYWORDS:	5
1. ÚVOD.....	11
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
2.1. Struktura proteinu p130Cas a jeho interakční partneři.....	13
2.1.1. Fosforylace proteinu p130Cas – stimuly a mechanismus	15
2.1.2. Kooperace p130Cas s malými GTPázami v regulaci aktinového cytoskeletu, signalizace p130Cas	17
2.1.3. Buněčná lokalizace p130Cas a jeho jaderná funkce	22
2.1.4. Propojení a rozdíly mezi tyrosinovou a serin/threoninovou fosforylací p130Cas	25
2.1.4.1. Interakce p130Cas s proteiny rodiny NSP.....	28
2.1.4.1.1 Mechanismy, jakými p130Cas podporuje vznik antiestrogenové rezistence	29
2.1.4.2. SR doména p130Cas a její interakce s 14-3-3 proteiny.....	31
2.1.5. SH3 doména.....	32
2.1.5.1. Specifita SH3 domén	33
2.1.5.2. Specifita SH3 domény p130Cas	34
2.1.5.3. Funkce SH3 domény p130Cas a význam jejích interakcí	36
2.1.5.3.1 Interakce s kinázami FAK, PYK2, Ack1.....	38
2.1.5.3.2 Interakce s fosfatázami PTP-PEST, PTP-1B.....	39
2.1.5.3.3 Interakce s GEF proteiny C3G, Dock180.	41
2.1.5.3.4 Interakce s transkripčním faktorem CIZ, invazivita	41
2.1.5.3.5 Interakce s cytoskeletálními proteiny.	43
3. MATERIÁL	44
3.1. Organismy	44
3.2. Kultivační média	44
3.2.1 Kultivace bakteriálních kmenů (a fágů)	44
3.2.2 Kultivace savčích buněk.....	45
3.3 Materiál použitý při práci s DNA	46

3.3.1	Purifikace a izolace DNA.....	46
3.3.2	Agarozová elektroforéza	47
3.3.3	Vektory	48
3.4	Materiál použitý při práci s proteiny	49
3.4.1	Purifikace proteinů, analýza relativních afinit, Phage display.....	49
3.4.2	Roztoky na přípravu lyzátů a buněk pro konfokální mikroskop	50
3.4.3	SDS-PAGE elektroforéza a Western blot	51
4.	METODY	55
4.1.	Purifikace a izolace plazmidové DNA	55
4.2.	Elektroforéza DNA v agarózovém gelu	57
4.3.	Kultivace tkáňových kultur.....	58
4.3.1.	Pasážování lidských buněčných linií HELA, MDA-231MB.....	58
4.3.2.	Příprava stabilátů buněčných linií.....	59
4.3.3.	Rozpěstování stabilátů buněčných linií.....	59
4.4.	Transfekce buněk HELA a MDA-231MB.....	60
4.5.	Příprava proteinových lyzátů ze savčích buněk.....	61
4.6.	Afinitní purifikace GST-fúzních proteinů	61
4.7.	Stanovení koncentrace proteinů	64
4.7.1.	Folinova metoda	64
4.7.2.	Denzitometricky z gelu	65
4.7.3.	Výpočet přes molární absorpční koeficient	65
4.8.	Analýza Phage display	66
4.9.	Analýza relativních afinit.....	71
4.10.	Stanovení hodnoty EC50	72
4.11.	Vazebné analýzy	74
4.11.1.	GST-SH3 „Pull down“	74
4.11.2.	Imunoprecipitace – endogenní, exogenní.....	75
4.12.	Tris – glycinová SDS gelová elektroforéza (SDS-PAGE)	76
4.12.1.	Barvení PAA gelu pomocí barviva Coomasie Blue.....	77
4.13.	Western blot.....	77
4.13.1.	Reverzibilní barvení proteinů na membráně pomocí Ponceau S	77
4.13.2.	Imunodetekce proteinů na membráně	78

4.14.	Imunohistochemické barvení savčích buněk	79
4.15.	Modelování struktur pomocí programu PyMOL	80
4.16.	Statistická a bioinformatická analýza.....	81
5.	VÝSLEDKY.....	82
5.1.	Analýza vazebného motivu SH3 domény proteinu p130Cas.....	82
5.2.	Modelování struktury SH3 domény p130Cas s peptidem PPPKPPR	88
5.3.	Analýza vlivu fosfomimikující mutace tyrosinu v sekvenci ALYD SH3 domén na vazbu ligandu	92
5.3.1.	Tyr90 SH3 domény kinázy Src	93
5.3.2.	Tyr12 SH3 domény proteinu p130Cas.....	95
5.4.	Hledání nových interakčních partnerů SH3 domény proteinu p130Cas	99
5.4.1.	Ověření vazby kandidátních proteinů s p130Cas	100
5.4.1.1.	Interakce kandidátních proteinů s SH3 doménou p130Cas	100
5.4.1.2.	Interakce kandidátních proteinů s celým proteinem p130Cas	101
5.4.1.3.	Kolokalizace p130Cas s PKN3	103
6.	DISKUZE	104
6.1.	Charakterizace vazebného motivu SH3 domény p130Cas	104
6.2.	Funkční význam potvrzených interakcí SH3 domény p130Cas	107
7.	ZÁVĚR.....	115
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	116

Seznam zkratek:

AK	Aminokyselina (A mino a cid)
ATB	Antibiotika (A ntibiotics)
BSA	Hovězí sérum albumin (B ovine s erum a lbumin)
BCAR1	Lidský homolog p130Cas podporující vznik rezistence na léčbu rakoviny prsu antiestrogeny (B reast c ancer a nti- e strogen r esistance 1)
BCAR3	Protein podporující vznik rezistence na léčbu rakoviny prsu antiestrogeny (B reast c ancer a nti- e strogen r esistance 3)
CCH	Konzervovaná C-koncová doména (C as family C -terminal h omology domain)
DTT	Redukční činidlo D ithiothreitol
EC50	Střední účinná koncentrace (half maximal e ffective c oncentration)
ECM	Extracelulární hmota (e xtracellular m atrix)
EGF	Epidermální růstový faktor (E pidermal g rowth f actor)
ER +/-	Buňky pozitivní (+), negativní (-) na E strogenové r eceptory
FA	Fokální adheze (F ocal A dhesion)
FBS	Fetální bovinní sérum (F etal b ovine s erum)
GAP	Protein urychlující inaktivaci malých GTPáz (G TPase a ccelerating p rotein)
GEF	Protein stimulující výměnu GDP za GTP u malých GTPáz vedoucí k jejich aktivaci (G uanine n ucleotide e xchange f actor)
GFP	Zelený fluorescenční protein (G reen f luorescence p rotein)
GSH	Glutation (G lutathione)
GST	Glutation S transferáza (G lutathione S -transferase)
GTP/GDP	Guanozintrifosfát/difosfát (G uanosine t riphosphate/ d iphosphate)
HEK293T	Lidská embryonální buněčná linie získaná z ledvin
HELA	Lidská buněčná linie odvozená od rakoviny děložního čípku
HLH	Helix-smyčka-helix (H elix- l oop- h elix)
HRP	Peroxidáza křenu selského (H orseradish p eroxidase)
IPTG	Indukční činidlo (I sopropyl β -D-1- t hiogalactopyranoside)
Kd	Disociační konstanta (D issociation c onstant)
kDa	Jednotka udávající molekulovou hmotnost (K ilo D alton)

LPA	Lysofosfatidová kyselina (L ysop h osphatidic a cid)
M13	Druh bakteriofága
MDA231MB	Lidská buněčná linie odvozená od rakoviny prsu (Human breast adenocarcinoma)
MMP	Matrixová metaloproteáza (Matrix metalloprotease)
NLS	Jaderný lokalizační signál (Nuclear localization sequence)
p130Cas	Adaptorový protein asociovaný s proteinem Crk (C rk- a ssociated s ubstrate)
PBS	Fosfátový pufr (P hosphate b uffered s aline)
PDB	Soubor popisující koordináty atomů proteinu (P rotein d ata b ank)
PDGF	Destičkový růstový faktor (P latelet- D erived g rowth f actor)
PPII	Levotočivý helix typu II (P olyproline h elix type II)
PTP	Tyrosinová protein-fosfatáza (P rotein t yrosine p hosphatase)
PxxP	Základní motiv polyprolinových ligandů (P-prolin, x- jakákoli aminokyselina)
RPMI 1640	Médium pro kultivaci savčích buněk
SB oblast	Src vazebná oblast p130Cas (S rc b inding region)
SD	Substrátová doména p130Cas (S ubstrate d omain)
SDS-PAGE	P olyakrylamidová g elová e lektroforéza probíhající v S DS pufru
SH2 doména	Doména homologní k druhé doméně kinázy Src (S rc h omology 2)
SH3 doména	Doména homologní k třetí doméně kinázy Src (S rc h omology 3)
SRD	Doména bohatá na seriny p130Cas (S erine r ich d omain)
SRE	Element na DNA, který se aktivuje po stimulaci buňky sérem (S erum r esponse e lement)
TBS	Pufr Tris (T ris b uffered s aline)
WT	Divoká varianta (W ild t ype)
YE (90,12)	Fosfomimikující mutace tyrosinu v motivu ALYD (SH3 Src, SH3 p130Cas; číslování myši)
YF (90,12)	Mutace tyrosinu v motivu ALYD mimikující nefosforylovatelný stav (SH3 Src a p130Cas; číslování myši)
YxxP	Motiv v substrátové doméně p130Cas bohatý na Tyr (Y; x – jakákoli AK, P – prolin)

1. Úvod

Protein p130Cas byl původně popsán jako jeden z hlavních proteinů fosforylovaných na tyrosinu v buňkách transformovaných onkogeny *v-crk* (Matsuda et al., 1990) a *v-src* (Reynolds et al., 1989). Později byl identifikován jeho lidský homolog protein BCAR1, který byl nalezen jako jeden z proteinů, jehož zvýšená exprese je zodpovědná za rezistenci pacientů s rakovinou prsu na léčbu tamoxifenem (Brinkman et al., 2000).

Protein p130Cas (Crk-associated substrate, BCAR1) se řadí mezi adaptorové proteiny a patří spolu s Nedd9 (Cas-L), EFS (SIN) a HEPL (CASS4) do rodiny proteinů Cas. Přestože tyto proteiny jsou vysoce homologní, především v jejich SH3 doméně a C-koncové doméně (viz kapitola 2.1), procesy jimi regulované mohou být i značně rozličné (shrnutí v Tikhmyanova et al., 2010). Protein p130Cas se konkrétně účastní regulace buněčné migrace (Honda et al., 1999), invazivity (Brabek et al., 2004), chemotaxe (Honda et al., 1999), apoptózy (Almeida et al., 2000), regulace buněčného cyklu (Oktay et al., 1999) a zastává i důležitou funkci v reakci na mechanické podráždění (Sawada et al., 2006).

Různé faktory v buňce (viz kapitola 2.1.1) spouštějí fosforylaci proteinu p130Cas z části závisle na jeho SH3 doméně, což vede ke změně organizace remodelace aktinového cytoskeletu (Ruest et al., 2001; Tazaki et al., 2010). Ta je nezbytná nejen v různých signálních drahách (viz Obr. 2.4), ale i v embryonálním vývoji. Myši s deletovaným genem pro *p130cas* (*p130cas*^{-/-}) umírají nedovyvinuté v děloze stejně jako myši postrádající pouze SH3 doménu proteinu p130Cas (*p130cas* SH3^{-/-}; Honda et al., 1998; Tazaki et al., 2008). Fibroblasty izolované z myši *p130cas*^{-/-} reexprimující protein p130Cas bez SH3 domény pak vykazovaly sníženou invazivitu a tvorbu metastáz v buňkách transformovaných aktivovanou kinázou Src (Brabek et al., 2005). In vivo se potom ukázalo, že zvýšená exprese či aberantní fosforylace proteinu p130Cas je pojená se zvýšenou tvorbou metastáz, s horší prognózou léčby chronické a akutní leukémie, rakoviny prsu, plic, jater, prostaty a kůže, a také s rezistencí na chemoterapeutické léky (Brinkman et al., 2000; shrnutí v Tikhmyanova et al., 2010). Nesprávná funkce proteinu p130Cas může být také spojována se vznikem onemocnění ledvin zvané nefronoftíza, která je často způsobena mutací Nephrocystinu 1 a je charakterizována patologickou atrofií ledvinových kanálků a tvorbou cyst (Hildebrandt et al., 1997). Protein p130Cas interaguje

s Nephronocystinem-1 v místě buněčných kontaktů u polarizovaných buněk ledvin (Donaldson et al., 2000).

Cílem této diplomové práce je nalezení nových interakčních partnerů p130Cas na základě detailní analýzy cílového vazebného motivu SH3 domény p130Cas. Identifikace nových interaktorů p130Cas a následná analýza významu těchto interakcí přispěje k pochopení procesu nádorové transformace a pomůže objasnit některé nejasnosti signálních procesů, ve kterých se protein p130Cas uplatňuje, popřípadě rozšíří spektrum jeho účinků. Tato práce také poskytuje rozšířenou anotaci SH3 vazebného motivu p130Cas, která by mohla do budoucna usnadnit identifikaci oligopeptidových sekvencí zodpovědných za vazbu k podobným SH3 doménám. Získání a popsání vysokoafinitních oligopeptidů vázajících se k SH3 doméně proteinu p130Cas by navíc mohlo pomoci k vývoji efektivních inhibitorů této domény, s možným uplatněním v protinádorové léčbě i léčbě některých onemocnění ledvin.

2. Literární přehled

2.1. Struktura proteinu p130Cas a jeho interakční partneři

Proteinu p130Cas nemá vlastní katalytickou aktivitu. V jeho struktuře lze však nalézt mnoho konzervovaných domén a sekvenčních motivů, které mohou být post-translačně modifikovány, především fosforylací na tyrosinech a serinech. Tyto modifikace umožňují vazbu řady proteinů a různých multiproteinových signálních komplexů (viz Obr. 2.1, Tab. 2.1). Struktura proteinu p130Cas je od N-konce složena z SH3 domény, polyprolinového úseku, substrátové domény (SD), domény bohaté na seriny (SRD), Src vazebné oblasti (SB) a C-terminální domény (CCH; shrnuto v Tikhmyanova et al., 2010; Donato et al., 2010).

SH3 doména proteinu p130Cas interaguje s polyprolinovými sekvencemi přítomnými u mnoha proteinů, například kináz **FAK**, **PYK2** a fosfatázy **PTP-PEST** či GEF proteinu **C3G** (citace viz Tab. 2.1 a 2.3; kapitola 2.1.5.3). Struktura této domény bude detailně popsána v samostatné kapitole (viz kapitola 2.1.5.1). U substrátové domény je nejlépe prostudována tyrosinová fosforylace patnáctkrát se opakujícího motivu bohatého na tyrosin YxxP. Fosforylace těchto tyrosinů umožňuje vazbu adaptorovým proteinům **Nck**, **Crk**, fosfatáze **SHP-2** a kináze **Abl** přes jejich SH2 domény (Mayer et al., 1995; shrnuto v Cabodi et al., 2010a; Tikhmyanova et al., 2010; viz Tab. 2.1). Mimo jiné se také předpokládá, že je substrátová doména zodpovědná za interakci s proteiny rodiny **Zyxin** (Yi et al., 2002). Struktura substrátové domény je pravděpodobně vnitřně neuspořádaná. Mechanické napětí proteinu p130Cas indukuje rozvolnění této domény. To umožní její fosforylaci a vazbu interakčních partnerů. Předpokládá se, že tato fosforylace substrátové domény indukovaná mechanickým stresem je zodpovědná za mechanosenzitivní účinky p130Cas (Sawada et al., 2006).

Po substrátové doméně následuje doména **SRD** („serine rich“ doména) charakterizovaná vysokým počtem serinových zbytků, u kterých je předpovězena intenzivní serinová fosforylace a vazba adaptorových proteinů rodiny 14-3-3 (Garcia-Guzman et al., 1999; viz kapitola 2.1.4.2). Strukturně SRD zaujímá konformaci čtyřhelixového svazku. Do této konformace se pravděpodobně skládají i SR domény ostatních členů rodiny Cas, ačkoli se jejich primární aminokyselinová sekvence v oblasti SR domény značně odlišuje (Briknarova et al., 2005).

	Interaktor	Význam interakce	Citace
SH3 3-65	FAK	Fosforylace p130Cas	(Polte and Hanks, 1995)
	FRNK	Fosforylace p130Cas	(Harte, 1996)
	PYK2	Fosforylace p130Cas	(Li and Earp, 1997)
	Ack1	Fosforylace p130Cas	(Modzelewska et al., 2006)
	PTP1B	Defosforylace p130Cas	(Liu, 1996)
	PTP-PEST	Defosforylace p130Cas	(Garton et al., 1997)
	C3G	Aktivace Rap1, Ras	(Kirsch et al., 1998)
	Dock180	Aktivace Rac1	(Hsia et al., 2003)
	CD2AP/CMS	Regulace aktin. cytoskeletu	(Kirsch et al., 1999)
	MICA1	Propojení s intermediálními filamenti	(Suzuki et al., 2002)
	Dynamin1	Inhibice internalizace EGFR	(Kang et al., 2011)
	CIZ	Aktivace transkripce MMPs	(Nakamoto et al., 2000)
	Vinculin	Regulace aktin. cytoskeletu	(Tatárová, dipl. pr. 2012)
P 74-87	?	?	?
SD 115-416	Rodina Crk	Aktivace C3G, Dock180	(Klemke et al., 1998; Sakai et al., 1994)
	Nck	Aktivace MAPK a PAK1-Cdc42 dráhy	(Schlaepfer et al., 1997)
	SHIP2	Vlnění membrány (tzv. „Ruffling“)	(Prasad et al., 2001)
	Abl	Fosforylace p130Cas	(Mayer et al., 1995)
	Zyxin, TRIP6	Buněčná motilita	(Yi et al., 2002)
SRD 422-614	14-3-3 proteiny	MAPK signalizace, regulace aktinového cytoskeletu	(Garcia-Guzman et al., 1999)
SB 635-667	Rodina kináz Src	Fosforylace p130Cas na SD	(Burnham et al., 1996; Nakamoto et al., 1996; Sakai et al., 1994)
	Bmx/Etk	Fosforylace p130Cas na SD	(Abassi et al., 2003)
	PI3K	Regulace fosforylace p130Cas	(Li et al., 2000; Riggins et al., 2003a)
	Grb2	MAPK dráha	(Hakak and Martin, 1999)
	Nephrocystin	Kontrola polarity epitel. buněk	(Donaldson et al., 2000)
CCH 730-870	Rodina proteinů NSP	Regulace fosforylace p130Cas	(Cai et al., 1999; Gotoh et al., 2000)
	Ajuba	Buněčná motilita	(Pratt et al., 2005)
	E2A/E47/E12	Represe transkripce p21	(Kim et al., 2004)
	Id2	Proliferace	(Law et al., 1999)
	Smad2/3	Represe transkripce TRE	(Kim et al., 2008)
	Rodina Cas	Dimerizace	(Law et al., 1999)

Tab. 2.1: Přímí vazební partneři p130Cas. Kromě napsaných interakcí známy další asociace - např. Paxillin, Tensin (Salgia et al., 1996), MMP14 (Gingras et al., 2008), SHP-2 (Manie et al., 1997), ER (Cabodi et al., 2004), PLCγ (Vuori et al., 1996), P140Cap (Di Stefano et al., 2004) či PP2A (Yokoyama and Miller, 2001). *Pozn.: Číslování aminokyselinových zbytků podle lidského p130Cas. TRE (Transcriptional response element), MMPs (matrix metalloproteases).*

Struktura i sekvence aminokyselin C-konce proteinu p130Cas je velmi konzervovaná. C-terminální část proteinu p130Cas lze rozdělit na oblast SB a doménu CCH. Oblast SB obsahuje sekvenci YDYVHL fosforylovanou v reakci na různé podněty a polyprolinovou sekvenci RPLSPSP (shrnutí v Tikhmyanova et al., 2010). Tyto dvě sekvence pak zprostředkovávají interakci s velkým počtem kináz, jako jsou kinázy z rodiny **Src** (Src, Fyn, Lyn, Lck), BMX/ETK a PI3K, dále s adaptorovým proteinem Grb2 a proteinem Nephrocystin (citace viz Tab. 2.1). CCH doména se podobně jako SRD skládá do konformace čtyř-helixového svazku strukturně podobného s doménou FAT („*Focal Adhesion Targeting*“) kinázy FAK (Mace et al., 2011). Díky této konformaci je CCH doména p130Cas schopna homo/heterodimerizovat s p130Cas či Nedd9, proteiny rodiny NSP (BCAR3/AND-34, CHAT-H), Ajuba, Smad3 a HLH transkripčními faktory (Cai et al., 1999; Gotoh et al., 2000; Kim et al., 2004; Law et al., 1999; Pratt et al., 2005; viz souhrnně Tab. 2.1).

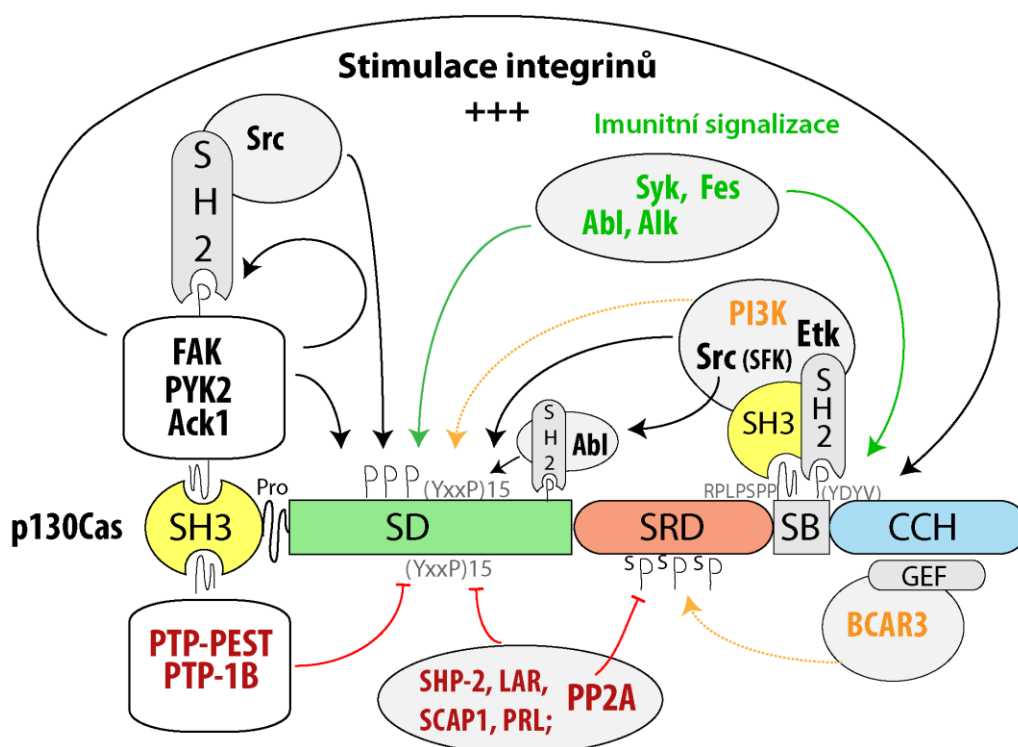
2.1.1. Fosforylace proteinu p130Cas – stimuly a mechanismus

Protein p130Cas je složený z 870 aminokyselin, což odpovídá molekulové hmotnosti 93,5 kDa (lidský, myší 874 aminokyselin). Na SDS-PAGE ale p130Cas migruje jako 130 kDa protein. Tato větší molekulová hmotnost je dána extenzivní fosforylací proteinu p130Cas. Fosforylace proteinu p130Cas se rychle mění v odpovědi na spouště vnitřních i vnějších signálů. Tyto změny ve fosforylaci ovlivňují konformaci, vazebnou schopnost p130Cas interagovat s proteiny, jeho buněčnou lokalizaci a stabilitu p130Cas regulací jeho citlivosti ke štěpení kaspázami (souhrnně v článku Bouton et al., 2001). Mezi nejprostudovanější stimuly vedoucí k fosforylaci p130Cas patří vazba integrinů k extracelulární hmotě (ECM), aktivace receptorů růstovými faktory (např. EGF, PDGF), hormony (např. antidiuretický hormon, endothelin) nebo jinými biologicky aktivními molekulami (např. glukosa, LPA, tamoxifen), mechanické napětí a tato fosforylace je závislá i na fázi buněčného cyklu (Cowell et al., 2006; Konrad et al., 2003; Sawada et al., 2006; shrnutí v Bouton et al., 2001). Podobný účinek má transformace buněk celou řadou onkoproteinů, jako jsou Ras, PI3K, Erbb2, Crk a Src (Brabek et al., 2004; Cabodi et al., 2010b; Matsuda et al., 1990; Pylayeva et al., 2009; Reynolds et al., 1989). Z toho plyne, že fosforylace proteinu p130Cas funguje jako universální přenašeč různých signálů. Specifity této signalizace se dosahuje přítomností různých multiproteinových komplexů

asociovaných s fosforylovaným p130Cas ([viz kapitola 2.1.2.](#)).

Dosud byly popsány 4 oblasti proteinu p130Cas více či méně modifikované fosforylací na Ser/Thr ([viz kapitola 2.1.4](#)) či Tyr: SH3 doména ([viz kapitola 2.1.5.3](#)), doména bohatá na seriny, substrátová doména a Src vazebná oblast. Nejlépe je popsán mechanismus fosforylace YxxP motivu v substrátové doméně, při kterém SH3 doména spolupracuje se Src vazebnou oblastí ([viz Obr. 2.1](#)). SH3 doména totiž váže kinázy FAK a PYK2, které mohou motiv YxxP buď přímo fosforylovat, anebo fosforylovat motiv YDYVHL v oblasti SB umožňující vazbu kinázám z rodiny Src (SFK) a Etk/Bmx (Abassi et al., 2003; Nakamoto et al., 1996; Ruest et al., 2001; Tachibana et al., 1997). Tyto kinázy pak mohou extenzivně fosforylovat YxxP. Nejefektivnější způsob fosforylace motivů YxxP v substrátové doméně ale spočívá v asociaci kinázy Src s p130Cas přes vazbu s kinázou FAK. Ta se totiž po stimulaci váže svojí polyprolinovou sekvencí k SH3 doméně p130Cas ([viz kapitola 2.1.5.3.1](#)) a autofosforylací Tyr397 vytváří vazebné místo pro SH2 doménu kinázy Src, kterou tato vazba také zároveň aktivuje (Ruest et al., 2001). Hmotnostní spektrometrie, cílená mutagenese a fosfopeptid-mapová analýza odhalila, že Src fosforyluje přinejmenším deset YxxP míst lokalizovaných mezi Tyr238 a Tyr414 (Luo et al., 2008; shrnuto v Tikhmyanova et al., 2010; [viz Tab. 2.2](#)). Různé kinázy ([viz kinázy z rodiny Src](#)) se mohou ve fosforylaci p130Cas navzájem zastupovat, proto totožnost kinázy závisí na buněčném typu a stimulačním podnětu (Klinghoffer et al., 1999).

U bílých krvinek motiv YDYVHL v oblasti SB p130Cas kromě kinázy FAK rozpoznávají a fosforylují kinázy SYK a FES známé především v signalizaci makrofágů, B a T lymfocytů (Jucker et al., 1997; Kim et al., 2011; [viz Obr. 2.1](#)). Protein p130Cas slouží jako mediátor signalizace buněčné adheze těchto bílých krvinek. Navýšení této signalizace vede k hyperfosforylaci motivů YxxP v substrátové doméně p130Cas kinázou Abl nebo Alk a ke vzniku lymfomů či leukémií (Ambrogio et al., 2005; Bazzoni et al., 1996; Salgia et al., 1996). Buněčná adheze neimunitních buněk spouští také fosforylaci motivů YxxP, a to především přes p130Cas-FAK-Src/Etk dráhu, eventuálně přes kinázu Abl (Abassi et al., 2003; Mayer et al., 1995; Ruest et al., 2001). Nezávisle na této dráze může p130Cas fosforylovat kináza Ack1 vázající se k SH3 doméně p130Cas ([viz kapitola 2.1.5.3.1](#)) a existuje i další dosud nevysvětlený mechanismus vedoucí k fosforylaci p130Cas vyžadující aktivitu lipidické kinázy PI3K, ale ne FAK či Src ([viz Obr. 2.1](#); Armulik et al., 2004; Modzelewska et al., 2006).



Obr. 2.1: Mechanismus fosforylace p130Cas. Schéma popisuje mechanismus fosforylace p130Cas a způsob, jakým na tomto procesu spolupracují různé domény p130Cas. Černé šipky ukazují integrinovou signalizaci, zelené navíc signalizaci imunitních buněk. Oranžové šipky s tečkovanou dráhou znázorňují dosud nevysvětlené působení proteinů PI3K a BCAR3 na fosforylaci p130Cas, zatímco červené čáry poukazují na defosforylaci p130Cas. Schéma nakresleno programem Adobe Illustrator verze CS5. Pozn.: PI3K se může vázat k p130Cas stejně jako Src přes SH2 a SH3 doménu (Etk přes SH2).

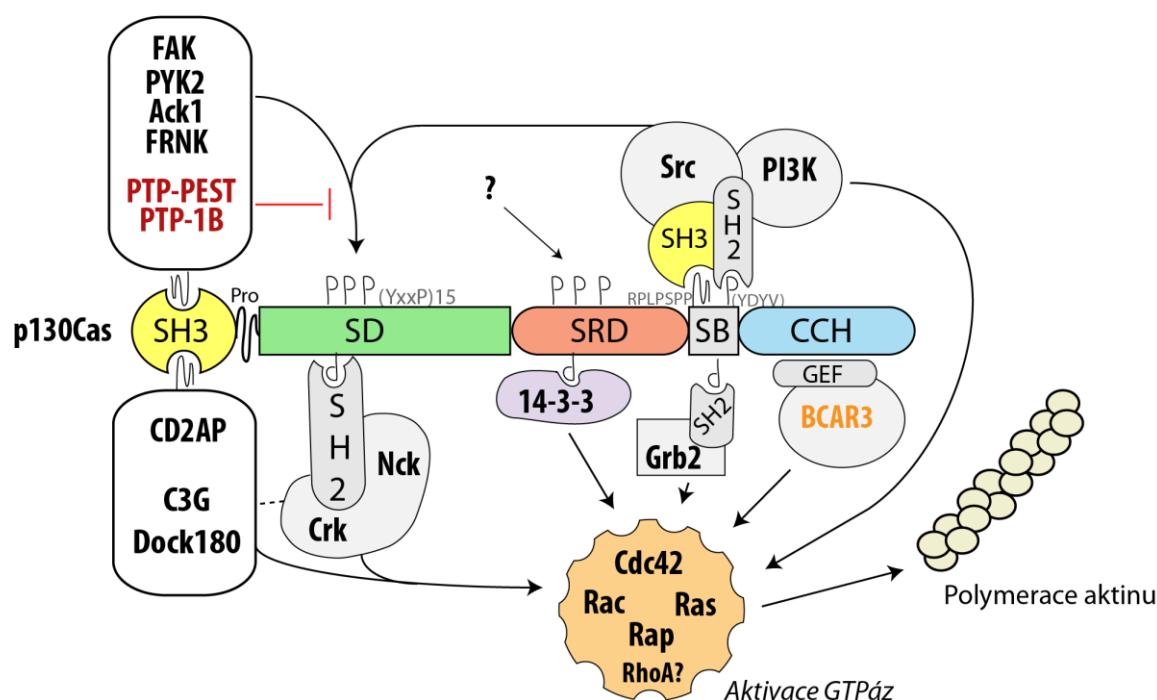
Tyrosinovou defosforylaci p130Cas vykovávají tyrosinové fosfatázy PTP-1B, PTP-PEST, SHP-2, LAR, SCAP1 a PRL (Manie et al., 1997; shrnuto v Tikhmyanova et al., 2010). Z nich se PTP-PEST a PTP-1B přímo váží k SH3 doméně p130Cas (Garton et al., 1997; Liu et al., 1996; viz kapitola 2.1.5.3.2). Obecně lze říci, že tyrosinová fosforylace p130Cas vede k indukci buněčné migrace, zatímco defosforylace ji ruší a často vede k degradaci p130Cas a apoptóze (shrnuto v Tikhmyanova et al., 2010).

2.1.2. Kooperace p130Cas s malými GTPázami v regulaci aktinového cytoskeletu, signalizace p130Cas

Buněčná migrace je funkčně spojená s remodelací aktinového cytoskeletu a s interakcí buňky k ECM. Tuto interakci závislou na aktinovém cytoskeletu zprostředkovávají v buňce makromolekulární struktury složené s různých proteinových

komplexů, zvané fokální adheze (FA). U migrujících buněk jsou FA vysoce dynamické a umožňují tvorbu trakčních sil nezbytných pro pohyb. Právě pro dynamiku těchto struktur je protein p130Cas esenciální, neboť zprostředkovává vazbu mezi komplexy aktinového cytoskeletu a kinázami důležitými pro sestavení a rozpad fokálních adhezí (shrnutí v Defilippi et al., 2006). Význam p130Cas pro aktinový cytoskelet je nejlépe doložen experimenty s *p130cas*^{-/-} fibroblasty. Tyto buňky vykazovali defekty ve formování stresových vláken, v buněčné migraci a ve snížené basální i sérem indukované invazivitě. Tento fenotyp byl zvrácen přidáním exogenního proteinu p130Cas (Brabek et al., 2004; Honda et al., 1999; Honda et al., 1998).

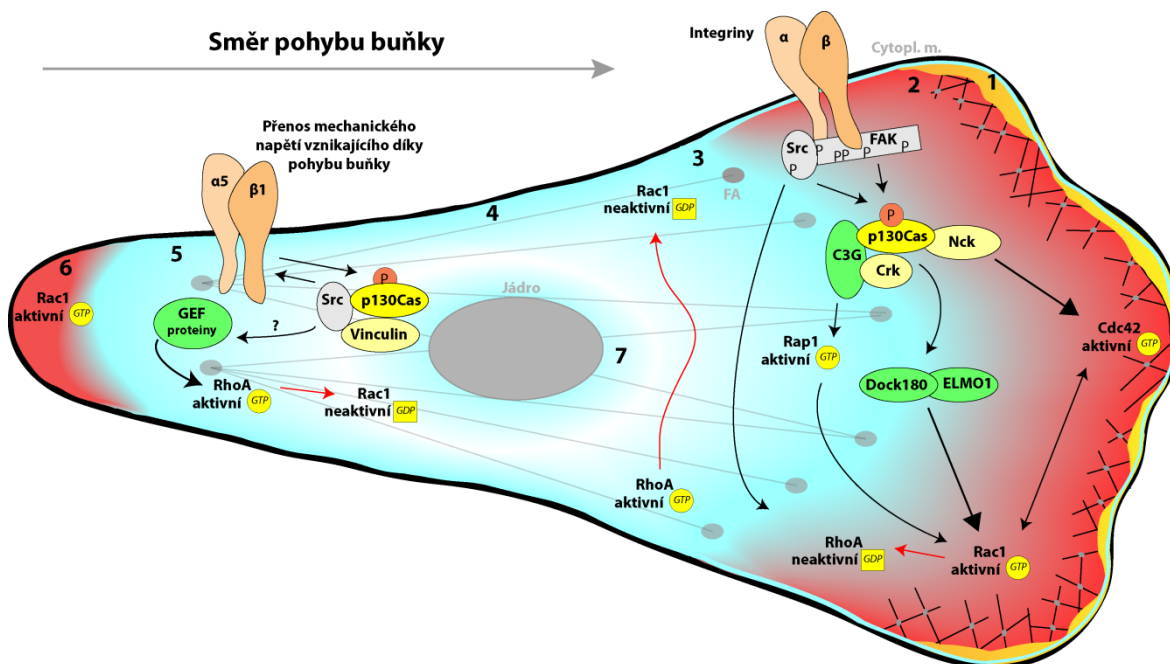
Prostorově a časově sladěná polymerace a depolymerace aktinového cytoskeletu důležitá pro buněčnou migraci je řízena malými GTPázami Rac, Rho a Cdc42, které se většinou liší svými účinky a místy působení v buňce (shrnutí v Guilluy et al., 2011). Tyto GTPázy oboustranně komunikují s p130Cas (Obr. 2.2 a 2.3; viz dále).



Obr. 2.2: Zjednodušená signální dráha se strukturou p130Cas. Fosforylace p130Cas stejně jako vazba GTP/GDP výměnných faktorů vede k aktivaci malých GTPáz důležitých pro remodelaci aktinového cytoskeletu. Obrázek nakreslen v programu Adobe Illustrator verze CS5.

Schopnost proteinu p130Cas indukovat buněčnou migraci koreluje do jisté míry s jeho zvýšenou tyrosinovou fosforylací (Cary et al., 1998; Garton and Tonks, 1999; Klinghoffer et al., 1999). Tyrosinová fosforylace substrátové domény p130Cas totiž

podporuje tvorbu komplexu p130Cas s adaptorovým proteinem Crk, který stimuluje funkci GTP/GDP výměnného faktoru Dock180, a tak aktivaci GTPázy Rac1. Tato GTPáza aktivuje komplex Arp2/3 katalyzující polymeraci aktinu, kinázu PAK1 a nepostradatelně se podílí na tvorbě lamelipodií (Chodniewicz and Klemke, 2004; Kiyokawa et al., 1998; Nobes and Hall, 1995).

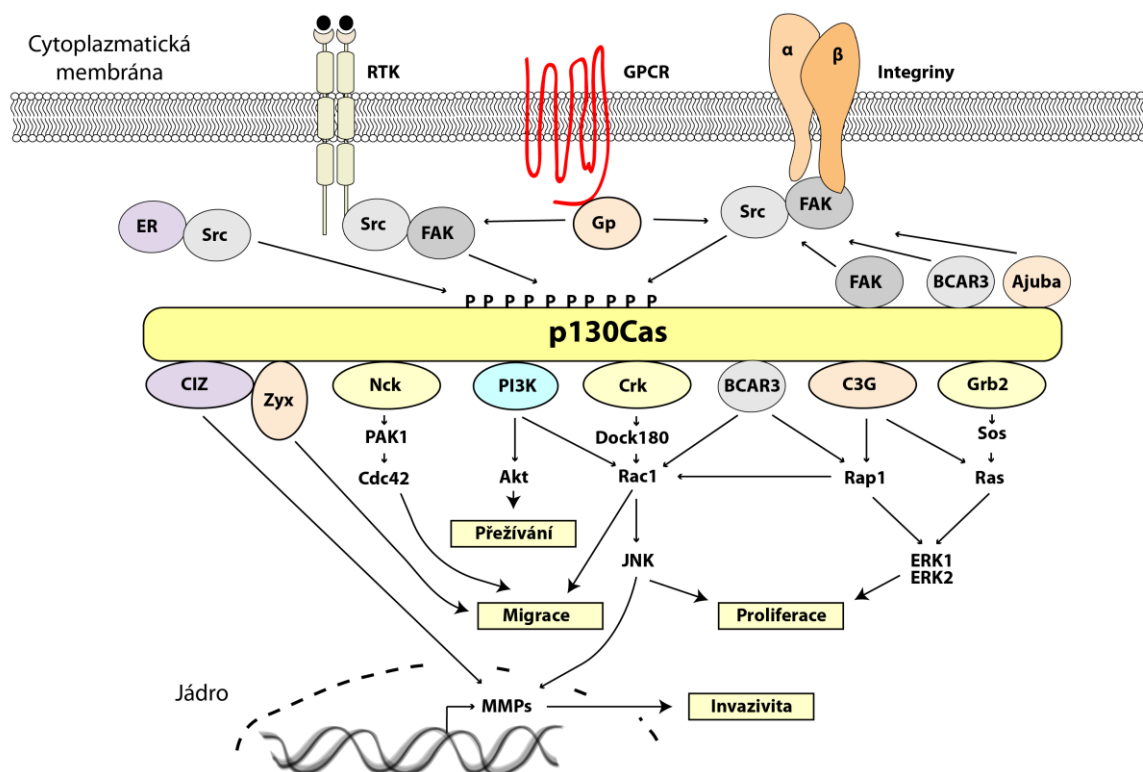


Obr. 2.3: Kooperace p130Cas s malými GTPázami vedoucí k migraci buňky. Buněčný pohyb vyžaduje přesně lokalizovanou a časově omezenou koordinovanou aktivaci a inaktivaci Rho GTPáz. Od přední části migrující buňky: 1. RhoA (světle modře) a Cdc42 (oranžovožlutě) se lokalizují na předním okraji buňky, ovlivňují vlnění membrány (tzv. „membrane ruffling“) a v případě Cdc42 i tvorbu filopodií. 2. Následuje širší zóna aktivace Rac1 (červeně) z části závislá na integrinech, kde dochází k inhibici aktivity RhoA. Stimulace integrinů ECM vede k fosforylaci p130Cas indukované kinázami Src a FAK. Protein p130Cas pak váže Crk a Nck umožňující aktivaci Rap1, Rac1 či Cdc42 přes proteiny GEF (zeleně). V této zóně se také začínají formovat fokální adheze a s aktinem asociované buněčné protruze. 3. V této části buňky RhoA generuje buněčnou kontrakci a inhibuje Rac1, což vede k dozrání fokálních adhezí. 4. Aby buňka mohla migrovat orientovaně, inhibuje tvorbu bočních protruzí inaktivací Rac1 (přes aktivaci RhoA). 5. Integriny A5β1 přenášejí mechanické napětí vznikající v zadní části buňky díky buněčnému pohybu přes p130Cas, a umožňují tak retrakci buňky. Tento přenos je závislý na p130Cas a vede k aktivaci RhoA. 6. V zadní části buňky byla popsána aktivace GTPázy Rac1, ale její funkce je v této oblasti neznámá. 7. Aktivní GTPáza RhoA byla také pozorována v perinukleární oblasti a v jádře. Obrázek nakreslen pomocí programu Adobe Illustrator verze CS5 z velké části na základě informací z (Guilluy et al., 2011; Huveneers and Danen, 2009).

GTPáza Cdc42 se uplatňuje především v tvorbě filopodií a navíc určuje směr migrace (Funasaka et al., 2010; Nobes and Hall, 1995). Cdc42 stimulovaná vysetím buněk na kolagenu aktivuje kinázu Ack1 (viz kapitola 2.1.5.3.1), která se váže k SH3 doméně p130Cas podobně jako FAK, protein p130Cas fosforyluje v substrátové doméně, a indukuje tak buněčnou migraci přes komplex p130Cas/Crk (Modzelewska et al., 2006).

Podobná fosforylace, tentokrát závislá na kináze Src aktivované vysetím buněk na fibronectinu, umožňuje vazbu proteinu Nck2, a tak vede k aktivaci Cdc42 (pravděpodobně přes kinázu PAK1) a indukci buněčné polarizace (Funasaka et al., 2010). Protein p130Cas spolupracuje na aktivaci GTPázy Rac1 nebo Cdc42 nejen s proteiny Crk a Nck, ale i s kinázou PI3K (Hawkins et al., 1995; Ojaniemi and Vuori, 1997; [Obr. 2.4](#)), rodinou proteinů NSP (Gotoh et al., 2000; [viz kapitola 2.1.4.1](#)) a 14-3-3 (Deakin et al., 2009; Garcia-Guzman et al., 1999; [viz kapitola 2.1.4.2](#)).

GTPáza RhoA ovlivňuje sestavování fokálních adhezí, formování stresových vláken umožňujících buněčnou kontrakci a retrakci stahujících se okrajů buňky (RhoA je také aktivní i 2 μ m od konce cytoplazmatické membrány vedoucího okraje buňky; [viz Obr. 2.3](#)). GTPáza RhoA je tedy důležitá pro sestavování FA, zatímco p130Cas se ukázal jako postradatelný pro jejich vznik, ale důležitý pro jejich dynamiku pravděpodobně přes regulaci GTPázy Rac1 (souhrnně v Guilluy et al., 2011; Huveneers and Danen, 2009). Přesto existují propojení mezi RhoA a p130Cas. Stimulace buněk bombesinem, LPA, fibronectinem či transformace krysích fibroblastů proteinem v-Crk vede k aktivaci GTPázy RhoA, která indukce tyrosinovou fosforylací p130Cas nezávisle na remodelaci aktinového cytoskeletu. Tato tyrosinová fosforylace p130Cas byla významně snížena inhibicí RhoA či jeho efektoru kinázy ROCK (Altun-Gultekin et al., 1998; Flinn and Ridley, 1996; Kumagai et al., 1993; Tsuda et al., 2002). Aktivita GTPázy RhoA roste především v pozdějších fázích buněčné adheze, pravděpodobně díky vznikající tenzi, a vede k inaktivaci Rac1 a Cdc42. Tato tenze vznikající mezi ECM a aktinovým cytoskeletem je přenášena integriny a způsobuje konformační změny proteinu p130Cas umožňující vazbu, a tak aktivaci kinázy Src ([viz Obr. 2.3](#)). Ta je známá především zprostředkovanou aktivací GTPázy Rac1 a inaktivací RhoA, ale v případě přenosu mechanického napětí od $\alpha 5\beta 1$ integrinů kináza Src aktivuje GTPázu RhoA pravděpodobně fosforylací jejích aktivátorů GEF (shrnuto v Huveneers and Danen, 2009). Důležitost p130Cas v přenosu buněčné tenze závisle na GTPáze RhoA, umožňující následně retrakci stahujícího se okraje buňky, naznačuje i fakt, že inhibice kinázy ROCK (efektor RhoA) významně potlačí migraci buněk MCF-7 indukovanou proteiny z rodiny Cas (Bargon et al., 2005). Siu se svými kolegy navíc naznačil, že vazba $\beta 1$ -integrinu ke kináze FAK vede k autofosforylaci FAK a následné tvorbě komplexu složeného z FAK-p130Cas-Dock180-RhoA-Vinculin, který je důležitý pro dynamiku adheze spermatid k Sertoliho buňkám. Tvorba tohoto komplexu korelovala s aktivací RhoA (Siu et al., 2011). Z těchto faktů vyplývá, že p130Cas funguje jako efektor v RhoA signalizaci, ale zároveň naznačují i opačný směr regulace.



Obr. 2.4: Souhrnné signální dráhy, na nichž se podílí p130Cas. Estrogenové receptory (ER), Receptory růstových faktorů (RTK), Receptory spřažené s trimerními G proteiny (GPCR), trimerní G proteiny (Gp), MMPs (matrixové metaloproteázy). Světle žluté jsou adaptorové proteiny, které se váží k p130Cas pouze po jeho fosforylaci (Nck, Crk, Grb2). Pozn.: Proteiny FAK, BCAR3 a Ajuba také podporují lokalizaci p130Cas do blízkosti plazmatické membrány. JNK a transkripční faktor CIZ se mohou po stimulaci přesouvat do jádra. Obrázek nakreslen v programu Adobe Illustrator verze CS5.

Protein p130Cas ovlivňuje buněčnou migraci i aktivaci jiných než GTPáz rodiny Rho (Rac1, Cdc42, potenciálně RhoA). Rodina GTPáz Ras, jejímž členem je i Rap1, ovlivňuje integrinovou signalizaci a zprostředkovává aktivaci kinázy ERK (Hattori and Minato, 2003; viz [Obr. 2.4](#)). Protein p130Cas aktivuje GTPázu Rap1 v komplexu s Crk vazbou GEF proteinu C3G nebo nově popsáným DOCK4 (Gotoh et al., 1995; Yajnik et al., 2003). Existuje i kontroverzní alternativní dráha p130Cas/BCAR3 vedoucí k aktivaci GTPázy Rap1 (viz kapitola 2.1.4.1). Ačkoli je buněčná migrace aktivovaná asociací komplexu p130Cas/Crk nezávislá na MAPK kinázové signální dráze, p130Cas slouží jako adaptor pro komponenty ERK1/2 signální dráhy a aktivuje kinázu JNK (Cary et al., 1998; Cho and Klemke, 2000; Shen and Guan, 2001). Komplex p130Cas/Crk se podílí na aktivaci JNK prostřednictvím Ras-Rac1-Pak1-MKK4 dráhy díky vazbě proteinu C3G stimulující přechod Ras GTPázy na aktivní formu s GTP a Dock180 aktivací Rac1 (Dolfi

et al., 1998; Girardin and Yaniv, 2001). Takto aktivovaná JNK následně fosforyluje transkripční faktory c-Jun (AP-1) a ATF2, které patří mezi „okamžité časné geny“, jejichž exprese a následná aktivace je nepostradatelná pro přechod buněk přes G1 fázi a proliferaci (Oktay et al., 1999). Protein p130Cas také slouží jako mediátor aktivace transkripce „okamžitých časných“ genů indukované kinázou Src prostřednictvím Grb2/Ras/MEK/ERK dráhy (Hakak and Martin, 1999; viz [Obr. 2.4](#)).

2.1.3. Buněčná lokalizace p130Cas a jeho jaderná funkce

Fosforylace proteinu p130Cas také odráží lokalizaci tohoto proteinu v buňce. Nefosforylované molekuly p130Cas jsou difúzně rozptýleny v cytosolu, zatímco fosforylované se nacházejí u membrán, v jádře (Kanner et al., 1991; Sakai et al., 1994) a jsou asociovány s cytoskeletem především ve fokálních adhezích (FA), podozómeh (Nakamoto et al., 1997; Polte and Hanks, 1997) a lamelipódiích (Fonseca et al., 2004). SH3 a CCH doména p130Cas se ukázaly být důležité pro cílení proteinu p130Cas do FA a lamelipódií, kde dochází k fosforylaci substrátové domény p130Cas (Dail et al., 2004; Donato et al., 2010; Nakamoto et al., 1997; Schrecengost et al., 2007). SH3 doména zprostředkovává tuto translokaci do FA především přes vazbu s proteinem FAK (Harte et al., 2000). Způsob translokace p130Cas do FA uplatňující CCH doménu dosud nebyl objasněn. Kromě toho se celá řada dalších proteinů ukázala být důležitá pro cílení p130Cas do lamelipódií, např.: BCAR3 (Schrecengost et al., 2007; viz [kapitola 2.1.4.1](#)) a protein Ajuba (Pratt et al., 2005).

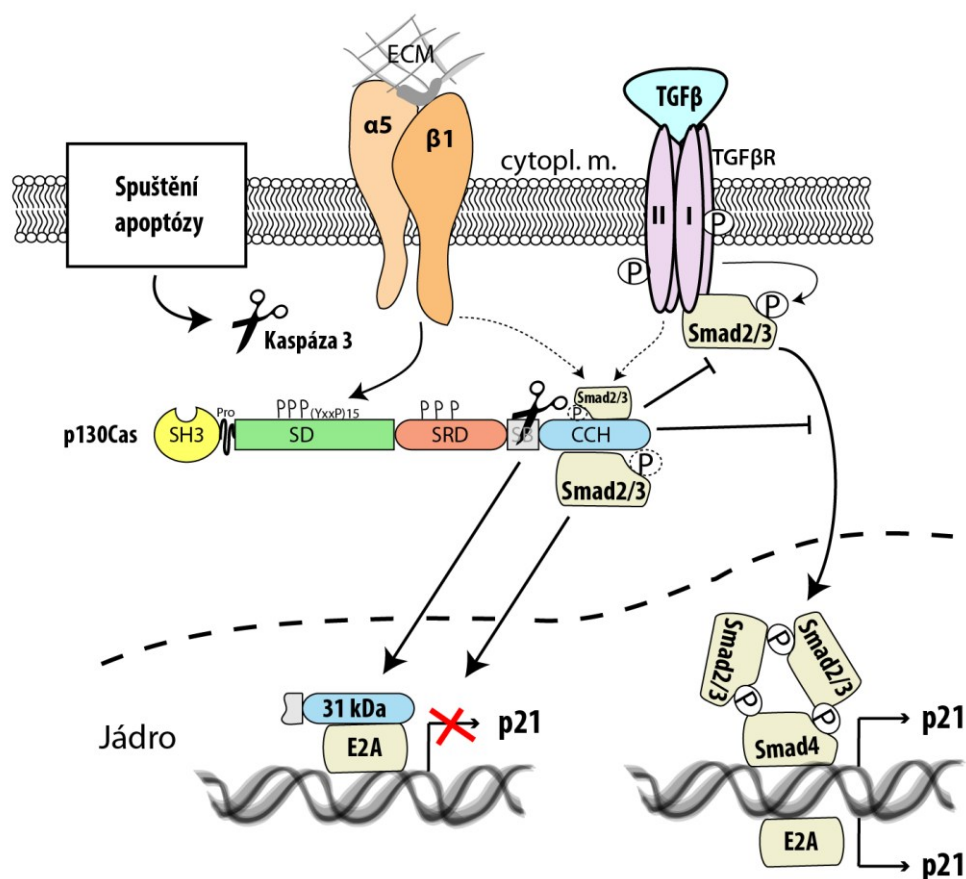
Existuje velké množství studií zabývajících se cílením p130Cas do blízkosti plazmatické membrány, ale poslední dobou se ukazuje, že p130Cas ovlivňuje i transport váčků, a není proto překvapující nabohacený výskyt proteinu p130Cas také u membrán endoplazmatického retikula v perinukleární oblasti (Di Stefano et al., 2004; Kang et al., 2011; Li et al., 2000).

Ještě méně prozkoumána je funkce p130Cas v jádře, přestože již roku 1991 Kanner se svojí skupinou ukázal, že se p130Cas vyskytuje v jádře kuřecích embryonálních buněk a jejich transformace konstitutivně aktivní kinázou Src vede k translokaci p130Cas k plazmatické membráně (Kanner et al., 1991). Výraznou lokalizaci p130Cas v jádře potvrdila také frakcionace lyzátů krysích buněk 3Y1 (Sakai et al., 1994). Tento fenotyp lze pozorovat i přímo na tkáňové úrovni, neboť vzorky izolované z nádorových tkání na rozdíl

od zdravých vykazují vysoký výskyt p130Cas v jádře (Deng et al., 2011). Tento rozdíl jaderné lokalizace p130Cas se ukazuje i na různých buněčných liniích, v jádře přetrvává především u invazivních linií, jako jsou MDA-231B, Hela, BT549 (Kim et al., 2004; Schrecengost et al., 2007, naše pozorování). Kromě toho protein p130Cas může být štěpen kaspázou 3 na 31 kDa C-terminální fragment (CCH s částí oblasti SB), který se dokonce specificky nabohacuje v jádře u všech analyzovaných buněk, pravděpodobně způsobuje rozpad FA a v nadbytku vede buňku do apoptózy či anoikis (Casanova et al., 2006; Kim et al., 2004).

Schopnost p130Cas se translokovat mezi jádrem a cytoplazmou naznačuje, že by p130Cas mohl přímo fungovat jako regulátor transkripce. Protein p130Cas vskutku reguluje např. buněčnou proliferaci i jinak než aktivací JNK signální dráhy ([viz kapitola 2.1.2](#)), a to přímou interakcí s transkripčními faktory, které aktivují expresi p21^{Cip} inhibujícího proliferaci. Po stimulaci integrinů p130Cas vyvazuje proteiny Smad2/3 v cytoplazmě, brání tak jejich aktivační fosforylaci a translokaci do jádra, a nedochází tedy k expresi p21 (Kim et al., 2008; Wendt et al., 2009). Na druhou stranu p21 chrání buňku proti apoptóze při nepříznivých podmínkách a jeho transkripce indukovaná transkripčními faktory E2A/E47. 31 kDa fragment p130Cas s proteiny E2A/E47 v jádře heterodimerizuje, a tak brání jejich vazbě na DNA (Kim et al., 2004, [viz Obr. 2.5](#)).

Protein p130Cas postrádá vlastní jaderný lokalizační signál (NLS), a proto je jeho transport do jádra zcela závislý na interakci s proteiny, které ho mají. Zkrácená forma p130Cas se dostává do jádra přes heterodimerizaci s E2A/E47 (Kim et al., 2004). Mechanismus translokace nesestřižené formy p130Cas do jádra zůstává neobjasněn, ale z fluorescenčních analýz lokalizace delečních mutantů p130Cas vyplývá, že SH3 doména p130Cas by mohla mít na jeho jadernou lokalizaci negativní vliv (Donato et al., 2010; Kim et al., 2008; Nakamoto et al., 1997; Tazaki et al., 2008).



Obr. 2.5: p130Cas jako negativní regulátor transkripce. Protein p130Cas je při indukci apoptózy štěpen kaspázou 3 na 31 kDa C-terminální fragment, který se společně s transkripčním faktorem E2A translokují do jádra, kde mu brání heterodimerizovat s koaktivátory promotoru genu *p21*. Po stimulaci integrinů fibronectinem (stimulací fosforylace SD p130Cas) či po stimulaci buněk TGFβ (především při buněčné transformaci) p130Cas váže Smad2/3 transkripční faktory, čím brání jejich aktivační fosforylaci a vazbě Smad4. To vede k přepnutí funkce TGFβ na indukci buněčné transformace zprostředkované kinázou p38MAPK (Wendt et al., 2009). Obrázek nakreslen v programu Adobe Illustrator verze CS5. Pozn: Kaspázu 3 znázorňují nůžky.

2.1.4. Propojení a rozdíly mezi tyrosinovou a serin/threoninovou fosforylací p130Cas

Již Reynolds a Matsuda popsali protein p130Cas jako protein fosforylovaný na tyrosinech v buňkách transformovaných onkogeny *v-src* (Reynolds et al., 1989) a *v-crk* (Matsuda et al., 1990), což odstartovalo novou éru poznání tohoto proteinu a významu této fosforylace. Fosforylace p130Cas na serin/threoninech byla donedávna málo studována, ač Kanner dva roky po identifikaci proteinu p130Cas ukázal, že tento protein je nejvíce fosforylován na serinech, částečně na threoninech. Tyrosinová fosforylace p130Cas je detekovatelná především u buněk transformovaných konstitutivně aktivní kinázou Src (Kanner et al., 1991). V databázích ukazujících post-translační modifikace proteinů lze nalézt v sekvenci p130Cas 27 tyrosinů, 21 threoninů a 37 serinů, u kterých byla předpovězena fosforylace společností Kinexus (<http://phosphonet.ca/default.aspx>, viz Tab. 2.2). Z těchto fosforylací byla již většina na Tyr ověřena, ale pouze pár na Ser/Thr. Z toho plyne, že spousta fosforylovaných serinových a threoninových zbytků zůstává neidentifikována - především v doméně bohaté na seriny.

Jak tyrosinová, tak Ser/Thr fosforylace p130Cas se zdá být regulována buněčným cyklem nebo adhezí a ovlivňuje citlivost ke štěpení kaspázami. Ačkoli tyto dva typy fosforylace pravděpodobně propůjčují proteinu p130Cas rozdílnou funkci (Pugacheva and Golemis, 2006), v některých případech regulují stejné signální děje a ukazuje se, že tyrosinová fosforylace ovlivňuje Ser/Thr a naopak (Kanner et al., 1991; Makkinje et al., 2009; Yokoyama and Miller, 2001). Během mitózy dochází k tyrosinové defosforylaci p130Cas a dalších proteinů fokálního komplexu (např. FAK) a současně k jejich Ser/Thr fosforylaci. Tato Ser/Thr fosforylace kinázy FAK ruší její interakci s p130Cas, a brání tak jeho tyrosinové fosforylaci a funkční integrinové signalizaci (Yamakita et al., 1999). Zodpovědná kináza dosud nebyla identifikována. Na konci mitózy se původní poměr obnoví z části díky Ser/Thr fosfatáze PP2A, která s proteinem p130Cas asociuje. Tato asociace je závislá na aktivitě tyrosinové kinázy Src, která stimuluje asociaci p130Cas s PP2A (Yokoyama and Miller, 2001). Ke ztrátě buněčné adheze dochází nejen při mitóze, ale i při apoptóze. Obojímu předchází tyrosinová defosforylace, ale serinová fosforylace má pravděpodobně stejně jako tyrosinová protektivní účinek proti štěpení kaspázou 3. Kaspáza 3 generuje v buňce 74 kDa a 31 kDa fragmenty p130Cas a tento proces je stimulován Tyr i Ser/Thr defosforylací p130Cas a inhibován fosfomimikujícími mutacemi serinů (kryší S411, S743) a tyrosinu (kryší Y751), které sousedí se dvěma místy štěpení na

p130Cas (Hoon Kim et al., 2003).

Ser/Thr fosforylace p130Cas může být stejně jako tyrosinová stimulována vysetím buněk na fibronectin, a je tedy závislá na adhezi (Schlaepfer et al., 1997), ale na rozdíl od tyrosinové má poněkud odlišnou dynamiku. Suspenzní MDA-231B buňky obnoví tyrosinovou fosforylaci na původní úroveň po uchycení na fibronectinu během několika minut, zatímco serinovou po několika hodinách (Makkinje et al., 2009). Tato serinová fosforylace závislá na adhezi a aktinovém cytoskeletu může být stimulována proteiny CHAT-H a BCAR3 z rodiny NSP ([viz kapitola 2.1.4.1](#)). Takto fosforylované seriny se nacházejí především v doméně bohaté na seriny (SR) proteinu p130Cas, dále Ser139 v substrátové doméně a Ser639 v motivu RLPSPP zodpovědném za vazbu kinázy Src (Makkinje et al., 2009; Regelman et al., 2006). Přesto BCAR3 ovlivňuje asociaci kinázy Src s p130Cas především pozitivně, a to indukcí jejich buněčné kolokalizace (Schuh et al., 2010; [viz kapitola 2.1.4.1](#)). Stimulace serinové fosforylace p130Cas a jeho sekvenčně velmi blízkého proteinu Nedd9 proteiny BCAR3 a CHAT-H je také spojena se zvýšeným invazivním charakterem buněk, a u T-lymfocytů je dokonce nezbytná pro jejich migraci a adhezi zprostředkovanou integriny (Makkinje et al., 2009; Regelman et al., 2006). Tyto procesy by serinová fosforylace p130Cas mohla ovlivňovat interakcí s proteiny rodiny 14-3-3 ([viz kapitola 2.1.4.2](#); Garcia-Guzman et al., 1999).

Oblast	Nedd9	p130Cas				Význam fosforylace
	Člověk	Člověk	Myš	Krysa	iso2	
SH3	Y12-p	Y12-p	Y12-p	Y106	Y12	Zrušení vazby interakč. partnerů
SD	Y112-p	Y128-p	Y132-p	Y226-p	Y132-p	Potenc. vazba proteinů Crk
SD	Q127	S134-p	N138	N232	N138	Korelace s invazivním fenotyp. buněk
SD	V134	S139-p	S143-p	S237	S143-p	Potenc. vazba proteinů Crk, Nck, SHIP2, Abl
SD	T156	Y165-p	Y169-p	Y263-p	Y169-p	
SD	Y166-p	Y179	Y183	Y277-p	Y183-p	
SD	Y177-p	Y192-p	Y196-p	Y290-p	Y196-p	
SD	P199	Y222-p	Y226-p	Y320	Y226	
SD	F201	Y224-p	Y228-p	Y322	Y228	
SD	/	Y234-p	Y238-p	Y332-p	Y238-p	
SD	Y214-p	Y249-p	Y253-p	Y347-p	Y253-p	
SD	Y223-p	Y267-p	Y271-p	Y365-p	Y271-p	
SD	I225	T269-p	T273-p	T367	T273	
SD	Y241-p	Y287-p	Y291-p	Y385-p	Y291-p	
SD	P246	S292-p	S296	S390	S296	
SD	Y261-p	Y306-p	Y310-p	Y404-p	Y310-p	
SD	T268	S313	S317	S411	S313	Brání štěpení Kaspázou 3
SD	N280	T326-p	T330-p	T424	T330	Potenc. vazba proteinů Crk, Nck, SHIP2, Abl
SD	C281	Y327-p	Y331-p	Y425	Y331	Ruší vazbu ke kináze Aurora A
SD	S296-p	P345	P349	P443	P349	
SD	G307	Y362-p	Y366-p	Y460	Y366	Potenc. vazba proteinů Crk, Nck, SHIP2, Abl
SD	Y317-p	Y372-p	Y376-p	Y470	Y376	
SD	/	T385-p	T389-p	T483	T389	
SD	P329	Y387-p	Y391-p	Y485-p	Y391-p	
SD	H350	Y410-p	Y414-p	Y508-p	Y414-p	Indukce degradace Nedd9 na proteasomu
SRD	S369-p	S428-p	S432	S526	S432	
SRD	S378	S437-p	S441	S535	S441-p	
SRD	G439	S494	S498	S592	S498	
SRD	H496	H552	Y556-p	Y650-p	Y556	
SRD	S503	G568	S572-p	G666	G572	
SRD	P521	S569	P573	P667	P573	Brání vazbě SH3 domény Src ?
SB	/	S639-p	S643	S737	S643-p	
SB	K609	S645	S649	S743	S649	Brání štěpení Kaspázou 3
SB	S618	Y653-p	Y657	Y751-p	Y657	
SB	Y629-p	Y664-p	Y668-p	Y762-p	Y668	Vazba Grb2, kináz z rodiny Src a kinázy FES
SB	Y631-p	Y666-p	Y670-p	Y764-p	Y670	
CCH	S667	K702-u	K706	K800	K706	?

Tab. 2.2: Ověřené fosforylace p130Cas či predikované na základě analogie s Nedd9. Fosforylované aminokyselinové zbytky ověřené hmotnostní analýzou (*modře*), či predikované na základě homologie s homologními proteiny u různých savců či příbuzného proteinu Nedd9. *Pozn.: Iso2 je kryší kratší isoforma p130Cas.*

2.1.4.1. Interakce p130Cas s proteiny rodiny NSP

Protein BCAR3 patří do rodiny proteinů NSP (NSP1; **BCAR3**/AND-34; **CHAT**/Shep1/NSP3) vázajících se k rodině proteinů Cas svojí C-terminální doménou. Tato C-terminální doména sdílí slabou homologii s Cdc25-homologní doménou proteinů GEF, ale na rozdíl od nich nemá enzymatickou schopnost, nejspíše díky pozměněné uzavřené konformaci (Cai et al., 1999; Gotoh et al., 2000; Mace et al., 2011). Přestože proteiny NSP nejsou schopny aktivovat, pravděpodobně ani přímo vázat, malé GTPázy in vitro, in vivo stimulují aktivitu nejen GTPázy Rap1 z rodiny Ras, ale i GTPáz Rac1 a Cdc42 z rodiny Rho (Cai et al., 2003a; Cai et al., 2003b; Dodelet et al., 1999; Gotoh et al., 2000; Mace et al., 2011). Za samotnou aktivaci GTPáz Rap1 a Rac1 jsou pak nejspíše zodpovědné proteiny C3G (GEF pro Rap1) a PI3K (aktivátor Rac1), se kterými p130Cas na rozdíl od proteinů rodiny NSP interaguje (Felekkis et al., 2005; Kirsch et al., 1998; Riggins et al., 2003a; Sakakibara et al., 2002). Proteiny rodiny NSP (BCAR3 a CHAT) se váží k proteinu p130Cas spíše konstitutivně než dynamicky, přesto může být tato interakce regulována fosforylací specifických tyrosinů. Zatímco fosforylace NSP indukovaná stimulací integrinů či receptorů růstových faktorů jejich vazbu neovlivňuje, fosforylace Tyr635 v jejich C-koncové doméně indukovaná receptory Eph afinitu vazby NSP s p130Cas snižuje (Cai et al., 1999; Dail et al., 2004). Také se zdá, že proteiny NSP mohou stabilizovat p130Cas tím, že fyzicky brání jeho degradaci (Roselli et al., 2010).

Proteiny z rodiny NSP společně s p130Cas zvyšují buněčnou migraci a jejich vzájemná interakce je esenciální pro správnou buněčnou motilitu (Dail et al., 2004; Schuh et al., 2010; Vanden Borre et al., 2011). Proteiny NSP ovlivňují buněčnou migraci indukcí translokace p130Cas do FA a lamelipodií (Makkinje et al., 2009; Riggins et al., 2003b; Schrecengost et al., 2007). Pro translokaci p130Cas na plazmatickou membránu je nezbytná SH2 doména (N-konec) proteinů NSP, přes kterou se mohou vázat k receptorům, jako jsou ErbB, Eph a EGFR (Dodelet et al., 1999; Jones et al., 2006; Lu et al., 1999). Lokalizace p130Cas na plazmatické membráně následně umožňuje tyrosinovou fosforylaci substrátové domény p130Cas kinázou Src (Riggins et al., 2003b; Schuh et al., 2010). Kromě toho BCAR3 a CHAT-H (hematopoetická izoforma CHAT) indukují také serinovou fosforylaci proteinů rodiny Cas ([viz kapitola 2.1.4](#)) a pro tuto fosforylaci je opět důležitá N-koncová část BCAR3 a CHAT-H (Makkinje et al., 2009; Regelman et al., 2006; Roselli et al., 2010).

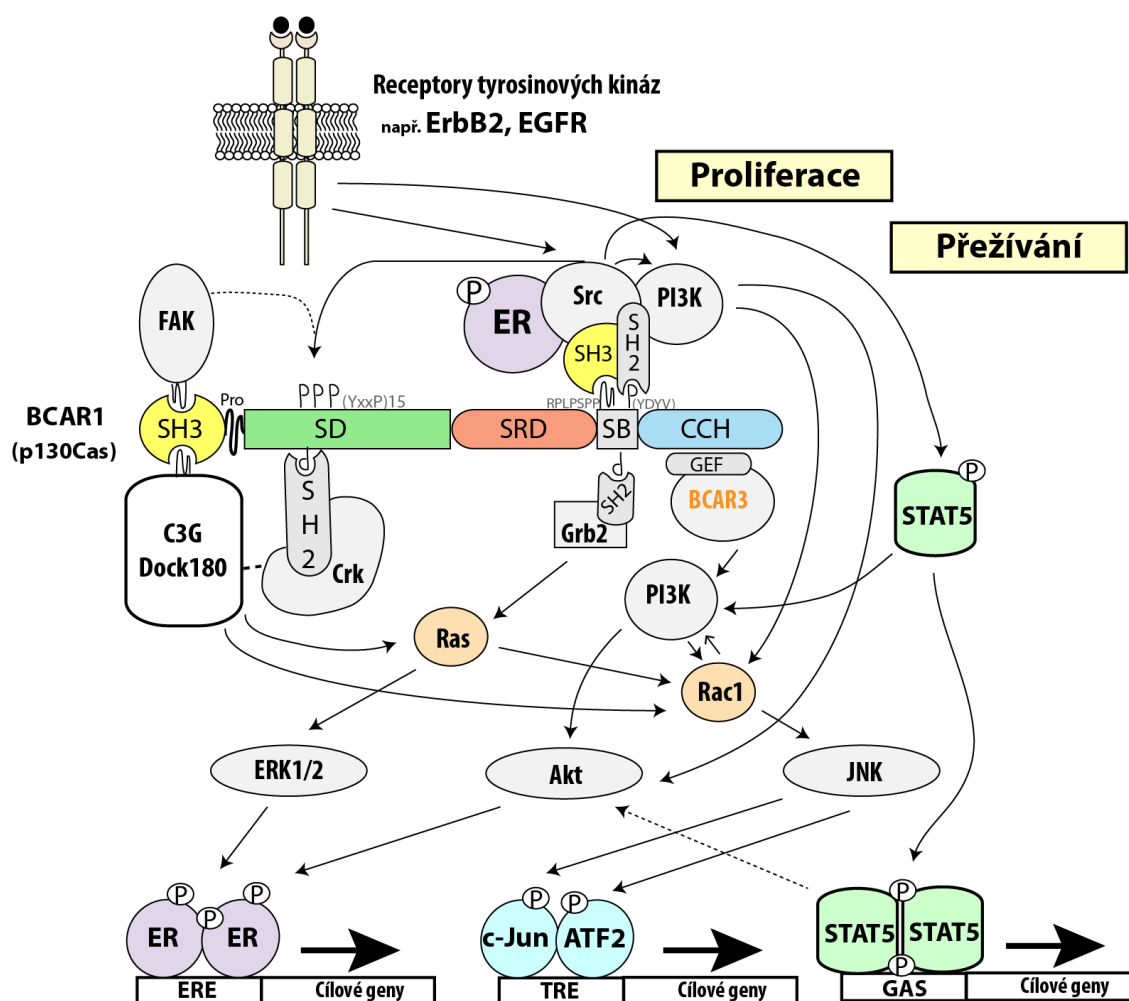
2.1.4.1.1. Mechanismy, jakými p130Cas podporuje vznik antiestrogenové rezistence

Antiestrogeny, jako je tamoxifen, jsou nejčastěji používány při léčbě pacientů s rakovinou prsu pozitivní na estrogenové receptory (ER; buňky ER+). Tamoxifen se váže in vivo na ER a inhibuje buněčnou proliferaci indukovanou estrogeny. Během terapie si ale mnoho pacientů vyvine rezistenci na tuto léčbu, a to většinou díky ztrátě exprese ER (buňky ER-) nebo zvýšenou aktivací ER signální dráhy i v nepřítomnosti ligandu (shrnuťo v Ring and Dowsett, 2004).

Vysoká exprese BCAR1 (lidský homolog p130Cas) a BCAR3 a tvorba jejich komplexů (BCAR1-BCAR3) koreluje s vyšší invazivitou nádorových buněk odvozených z karcinomu prsu (buňky ER-; Near et al., 2007). Navíc nadprodukce jak proteinu BCAR3, tak BCAR1 indukuje rezistenci lidským buněčným liniím odvozených od rakoviny prsu ER+ vůči antiestrogenům, jako jsou tamoxifen či faslodex (Brinkman et al., 2000; van Agthoven et al., 1998). To naznačuje, že protein BCAR3 by mohl indukovat antiestrogenovou rezistenci přes BCAR1. Tato signalizace se ale nepotvrdila a spíše to vypadá, že BCAR3 a BCAR1 indukují antiestrogenovou rezistenci (Obr. 2.6) přinejmenším zčásti nezávisle na sobě (Vanden Borre et al., 2011).

Protein Nedd9 na rozdíl od BCAR1 nepodporuje vznik antiestrogenové rezistence především díky odlišnosti jeho substrátové domény. Substrátová doména Nedd9 totiž ve své sekvenci obsahuje méně YxxP motivů než substrátová doména proteinu BCAR1, které umožňují vazbu proteinům Nck a Crk (Bouton et al., 2001; Brinkman et al., 2010). Pro navození rezistence je důležitá také interakce s kinázou Src, která zmíněné motivy fosforyluje (Brinkman et al., 2010; viz kapitola 2.1.1). Estrogenové receptory po stimulaci estrogeny aktivují Src, což vede k rychlé a dočasné asociaci komplexu ER, Src, PI3K s BCAR1. Tento komplex pak podporuje aktivitu ERK1/2 a produkci cyklinu D1 důležitého pro vznik antiestrogenové rezistence (Cabodi et al., 2004). Přidání tamoxifenu k buňkám ER+ sníží fosforylaci substrátové domény BCAR1, ale po 7 dnech kontinuální kultivace buněk s tamoxifenem se obnoví původní fosforylace vedoucí k buněčné proliferaci. Citlivost buněk k tamoxifenu se opět obnovila po deleci substrátové domény BCAR1 či po inhibici kinázy Src (Cowell et al., 2006). Zablokováním signalizace substrátové domény BCAR1, v jejímž důsledku dochází k poklesu aktivace ERK a PI3K/Akt signální dráhy, lze pak obnovit anti-proliferativní účinek tamoxifenu i u buněk ER- (Soni et al., 2009). Nedávno se navíc ukázalo, že použití tamoxifenu vede u buněk

ER+ k nadprodukci BCAR1 a tato nadprodukce pak podporuje buněčnou proliferaci a přežívání přes Src/EGFR/STAT5 dráhu i v přítomnosti tamoxifenu (Riggins et al., 2006; Soni et al., 2009). Rezistenci buněk na tamoxifen lze také indukovat transfekcí buněk plazmidy kódujícími proteinový receptor ErbB2, pro jehož signalizaci je protein BCAR1 esenciální. Zde je buněčná proliferace (v přítomnosti tamoxifenu) pravděpodobně výsledkem aktivace kinázy ERK a GTPázy Rac1 přes PI3K/Akt signalizaci závislé na proteinu BCAR1 (Tornillo et al., 2010).



Obr. 2.6: Buněčné dráhy BCAR1 a BCAR3 podporující vznik Antiestrogenové rezistence. Protein BCAR1 (p130Cas) podporuje životaschopnost buněk v přítomnosti tamoxifenu přes PI3K-Akt či Src-STAT5 dráhu a proliferaci přes Crk-Ras-Rac1-JNK nebo Crk-Ras-ERK1/2 dráhy. Mezi cílové geny patří např. Cyklin D1. Transkripční faktor STAT5b také aktivuje transkripci kinázy Akt (*přerušovaná čára*). *TRE* (*TPA response element*), *ERE* (*estrogen response element*), *GAS* (*Gas - like element*). Obrázek nakreslen pomocí programu Adobe Illustrator verze CS5.

Způsob indukce antiestrogenové rezistence proteinem BCAR3 není dosud objasněn, ale nevyžaduje interakci s BCAR1 a samotná indukce tyrosinové fosforylace BCAR1 proteinem BCAR3 není dostačující pro navození rezistence (Schuh et al., 2010; Vanden Borre et al., 2011). BCAR3 jako jediný z rodiny NSP indukuje expresi cyklinu D1 vedoucí k antiestrogenové rezistenci. Tato exprese pravděpodobně není způsobena aktivací GTPázy Rac1 a kinázy Akt, protože jejich aktivaci podporují i ostatní proteiny rodiny NSP (Felekkis et al., 2005; Near et al., 2007; Vanden Borre et al., 2011).

2.1.4.2. SR doména p130Cas a její interakce s 14-3-3 proteiny

Význam serinové fosforylace proteinu p130Cas, především v SR („serine rich“) doméně, zůstával donedávna nepovšimnut, ale začíná se ukazovat, že může mít podobnou funkci jako fosforylace na tyrosinech ([viz kapitola 2.1.4](#)). Jeden z efektů serinové fosforylace představuje vytvoření vazebného motivu pro proteiny rodiny 14-3-3. Rodina proteinů 14-3-3 patří mezi důležité adaptorové proteiny vázající se k mnoha fosforylovaným proteinům na serinech a threoninech, a tak umožňuje regulovat buněčné dělení, proliferaci nebo remodelaci aktinového cytoskeletu vedoucí k aktivaci buněčné migrace (Deakin et al., 2009; Pozuelo Rubio et al., 2004). Tato rodina proteinů má u savců 9 vysoce homologních členů a protein p130Cas byl s odlišnou afinitou imunoprecipitován přes svoji SR doménu různými jejími zástupci, z nichž nejlépe je popsána interakce s 14-3-3ζ (Garcia-Guzman et al., 1999). Navíc se ukázalo, že zvýšená exprese 14-3-3ζ u pacientů s rakovinou prsu je stejně jako u p130Cas spojena s rezistencí k tamoxifenové léčbě a horší prognózou (Brinkman et al., 2000; Frasor et al., 2006).

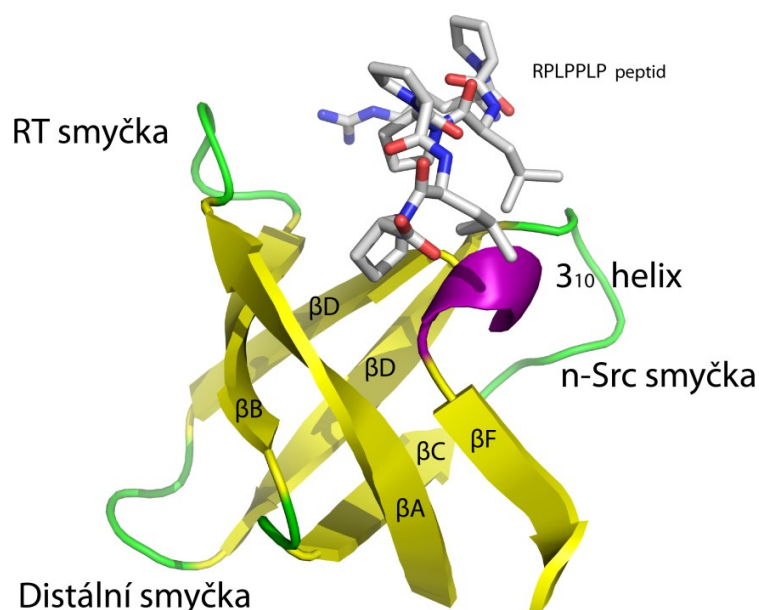
Po adhezi buněk na fibronectin dochází k extenzivní serinové fosforylaci p130Cas a tato fosforylace podporuje interakci 14-3-3ζ s proteinem p130Cas, zatímco ztráta vazby buňky k ECM či odebrání séra z kultivačního média ji redukuje. Tato interakce probíhá pouze s fosforylovaným p130Cas, neboť ošetření p130Cas serinovou fosfatázou tuto vazbu ruší (Garcia-Guzman et al., 1999; Pozuelo Rubio et al., 2004; Schlaepfer et al., 1997). Buněčná adheze také ovlivňuje buněčnou lokalizaci interakce 14-3-3ζ s p130Cas. 20 minut po uchycení buňky na fibronectin p130Cas silně kolokalizuje s 14-3-3ζ v lamelipódiích, po 4 hodinách se jejich kolokalizační signál rozptýlí po celé buňce (Garcia-Guzman et al., 1999).

SR doména se skládá ze 4 helixů tvořících svazek a v její sekvenci se nachází 11 evolučně konzervovaných Ser/Thr zbytků. Tato doména zároveň obsahuje motiv RxxpSxP (R arginin, x jakákoli AK, pS fosforylovaný serin) vhodný pro vazbu proteinů 14-3-3 a ideální pro fosforylaci. Nachází se totiž ve smyčce mezi dvěma helixy, a je tak přístupný enzymatické reakci. Mutace serinového zbytku 592 (číslování kryší; Ser494 lidské) v tomto motivu významně snižuje schopnost vazby proteinů 14-3-3 k p130Cas (Briknarova et al., 2005). Ačkoli SR doména je odpovědná za hlavní vazbu p130Cas k 14-3-3, po její delecii lze pořád, ač slabě, detekovat zbytkovou interakci p130Cas k 14-3-3. Za tuto vazbu nezávislou na SR doméně p130Cas pravděpodobně může jiný nekanonický motiv v sekvenci p130Cas lokalizovaný mimo substrátovou a SR doménu (Garcia-Guzman et al., 1999).

SR doména p130Cas se také ukázala být důležitá pro transkripční aktivaci DNA oblasti SRE („serum response element“), která je indukována kinázou Src nezávisle na fosforylaci substrátové domény p130Cas. Tato aktivace SRE vedoucí k přepisu „okamžitých časných“ genů je pravděpodobně důsledkem aktivace kinázy ERK, k jejíž zvýšené enzymové aktivitě napomáhá 14-3-3 interakcí s Grb2 a p130Cas (Hakak and Martin, 1999; viz Obr. 2.4).

2.1.5. SH3 doména

SH3 doména je důležitá doména konzervovaná od kvasinek po savce a jejich počet zhruba koreluje s komplexitou genomu - lidský jich kóduje okolo 649, kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* 165 (popsáno v databázi Pfam, duben 2012). SH3 domény se skládají z okolo 60-70 aminokyselin a jsou často součástí struktury proteinů regulujících aktinový cytoskelet, endocytózu, signální transdukcii a buněčnou smrt (Carducci et al., 2012). Mohou ovlivňovat i lokalizaci proteinů, jako v případě adaptorového proteinu p130Cas, či ovlivňovat aktivitu kináz intramolekulární interakcí, jako například u kinázy Src (Nakamoto et al., 1997; Nakamoto et al., 1996). SH3 domény mají velmi konzervovanou kompaktní strukturu β -barelu složeného z 5-6 anti-paralelních β -řetězců uspořádaných do dvou β -listů, které svírají přibližně pravý úhel. β -řetězce jsou propojeny 3_{10} helixem a smyčkami rozličných délek, z nichž funkčně nejvýznamnější jsou RT, n-Src a distální smyčka (viz Obr. 2.7).

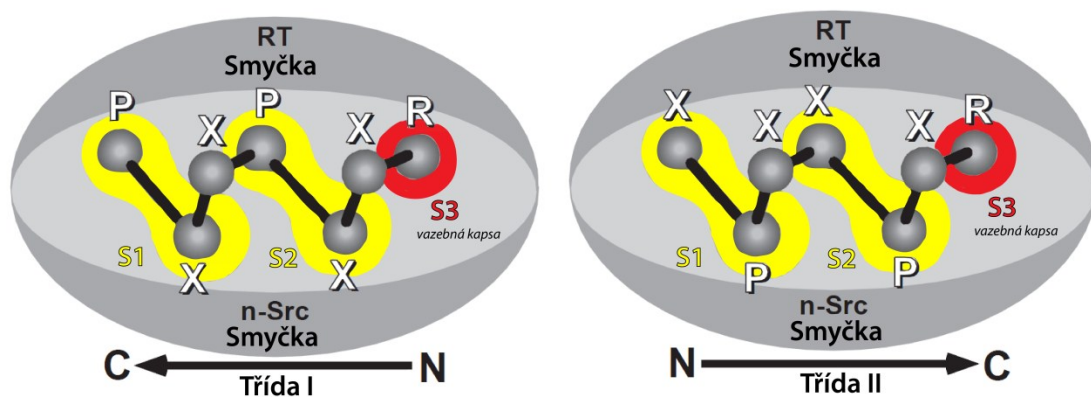


Obr. 2.7: Schematicky znázorněna struktura SH3 domén s peptidem RPLPPLP (na kináze Src, PDB 1QWF, Sekundární struktura upravena na základě dat z (Yu et al., 1993). Žlutě znázorněny β řetězce, fialově α helix, zeleně smyčky. Vyobrazeno pomocí programu PyMOL verze 1.4.1 (DeLano, 2002).

2.1.5.1. Specifita SH3 domén

SH3 ligandy jsou charakterizovány velmi zjednodušeně základním motivem PxxP (P - prolin, x - jakákoli AK) vytvářejícím polyprolinový helix typu II. Vazebný povrch většiny SH3 domén je tvořen třemi oblastmi: Dvěma hydrofobními žlábkami (S1, S2) tvořenými především aromatickými aminokyselinovými zbytky, které umožňují vazbu cílovému polyprolinovému ligandu, a žlábkem primárně utvořeným smyčkami RT a n-Src, který zajišťuje specifitu (S3). Jelikož jsou tyto smyčky obecně sekvenčně variabilní mezi různými SH3 doménami, hrají důležitou roli v určení rozpoznávané vazebné sekvence. Kromě hydrofobních aminokyselin většinou obsahují kysele nabitě aminokyselinové zbytky umožňující elektrostatickou interakci s pozitivně nabitými aminokyselinami ligandu, jako jsou arginin a lysin. Ty se ukázaly být důležité pro vazbu k SH3 doménám, a to nejen pro přídatnou elektrostatickou interakci, ale i pro orientaci ligandu v SH3 vazebném žlábkem. Těmto bazickým AK ohraničující základní motiv PxxP z jedné či druhé strany se říká kotvící aminokyseliny. Obecně většina SH3 domén tedy váží sekvence, které obsahují motiv buď typu I $(R/K)_{-3}x_{-2}x_{-1}P_0x_1x_2P_3$, či typu II $P_0x_1x_2P_3x_4(R/K)_5$ (viz Obr. 2.8). Na základě obměny aminokyselin vazebného žlábkem některé SH3 domény preferují

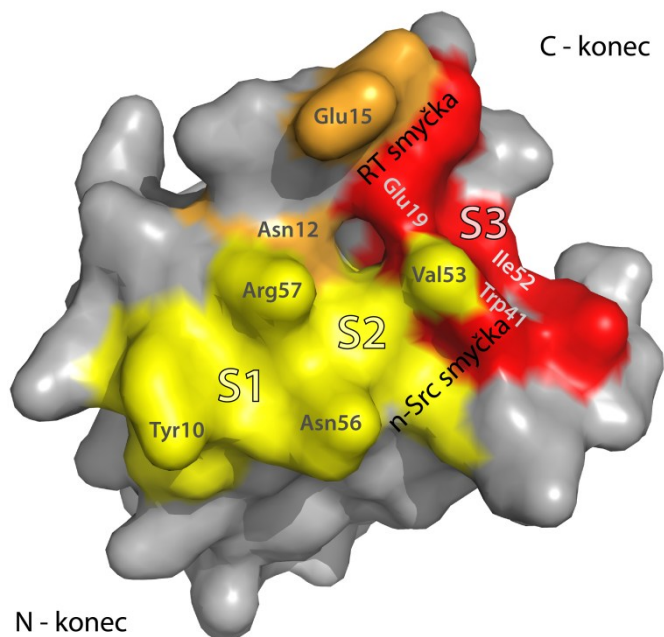
peptidy mající jeden z těchto motivů, zatímco jiné je téměř nerozlišují a existují i ligandy úplně postrádající tento charakteristický motiv. Kromě výše napsaného klasického motivu mají některé SH3 domény odlišné sekvenční preference či afinitu pro bazické aminokyseliny (Posern et al., 1998; Carducci et al., 2012; shrnuto v Li, 2005). Specifitu rozpoznávaného ligandu zvyšují i sekvence lemující základní 6-7 aminokyselinový motiv (Agrawal and Kishan, 2002; Wisniewska et al., 2005). Přesto je obecně afinita SH3 domén ke svým interakčním partnerům relativně nízká pohybující se v rozmezí disociační konstanty (K_d) 100 nM – 200 μ M a s okrajovou selektivitou (Li, 2005; Mayer, 2001; Posern et al., 1998). Překvapivě interakce SH3 domén s vazebnými partnery může být regulována fosforylací na tyrosinu 7 (číslování od N-konce SH3; Tatarova et al., in press) ve vysoce konzervovaném motivu ALY₇D (viz Obr. 2.10).



Obr. 2.8: Určení orientace ligandu na povrchu SH3 domény. Hydrofobní kapsy S1 a S2 znázorněny žlutě, žlábek S3 udávající specifitu červeně. (P znázorňuje prolin, R kotvící Arginin, X jakoukoli aminokyselinu). Převzato a upraveno z (Mayer, 2001).

2.1.5.2. Specifita SH3 domény p130Cas

Stejně jako u jiných SH3 domén tvoří RT a n-Src smyčka SH3 domény p130Cas vazebné místo pro ligand. Konzervované aminokyselinové zbytky Leu9, Tyr10, Glu19, Trp41 a pro54 (číslování AK podle lidského p130Cas) zde vytváří hydrofobní žlábek vhodný pro vazbu motivu PxxP, který se váže v orientaci od N- k C- konci (typ II). Tyr10 (respektive myši Tyr12) byl identifikovaný jako místo tyrosinové fosforylace SH3 domény p130Cas ze Src transformovaných buněčných fibroblastů (Luo et al., 2008) a v naší laboratoři poukázáno, že tato fosforylace mění schopnost vázat SH3 domény p130Cas svoje interakční partnery (Janostiak et al., 2011; viz kapitola 2.1.5.3).



Obr. 2.9: Vazebný povrch SH3 domény p130Cas. Žlutě znázorněny vazebné žlábků S1, S2 (*Leu9*, *Tyr10*, *Gly40*, *Val53*, *Pro54*, *Asn56*, *Arg 57*), červeně žlábek S3 udávající specifitu (*S16*, *Glu19*, *Leu38*, *Trp41*, *Ile52*). Oranžově znázorněny nabitě aminokyselinové zbytky *Glu15* a *Asn12* lišící se od většiny známých SH3 domén. Ty společně s *Glu19* určují výsledný polární charakter vazebného povrchu SH3 domény p130Cas odlišného od hydrofobního povrchu většiny jiných SH3 domén (PDB kód 1WYX; Wisniewska et al., 2005). Vyobrazeno pomocí programu PyMOL verze 1.4.1 (DeLano, 2002).

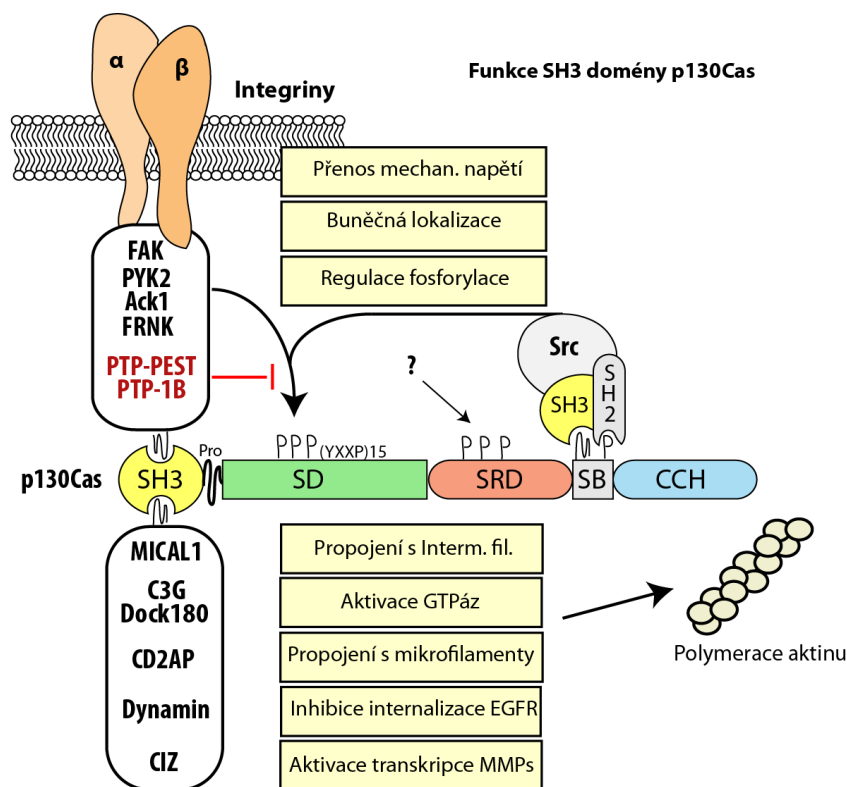
Specifity SH3 domény p130Cas dosahuje díky unikátním aminokyselinovým záměnám - především Asn12 a Arg57 místo konzervovaných Tyr či Phe a záporně nabytou Glu15 namísto jiných variabilních aminokyselin (viz Obr. 2.9; Sakai et al., 1994; Wisniewska et al., 2005). Tyto aminokyseliny umožňují polární interakci s charakteristickým lysinem na pozici dva ($P_0 \times K_2P$) popsáným na základě vazebné sekvence známých interakčních partnerů SH3 domény p130Cas a zároveň jsou zodpovědné za unikátní polární charakter u jinak obvykle hydrofobních žlábků S1 a S2 (Wisniewska et al., 2005). Třetí vazebné místo S3 vykazuje vysokou strukturní diverzitu mezi SH3 doménami, a proto patří mezi další faktory hrající rozhodující úlohu ve specifitě vazby. V SH3 doméně p130Cas je vazebný žlábek S3 tvořen aminokyselinami Trp41, Ser16 a Glu19, které pravděpodobně interagují s kotvící bazickou aminokyselinou ve vazebném motivu ligandu (Wisniewska et al., 2005).

human-p130Cas	NHLNVLA K ALYD N VA (E) S (P) DELSFRKGDIMTVLEQD-----	36
human-Nedd9	-Y K NLMARALYD N V P EC A EELAFRKGDILTVIEQN-----	35
mouse-EFS	-T S AQLARALYD N T A ES P QELSFRRGDVLRLVQREG-----	36
human-Abl	-T S AQLARALYD N T A ES P QELSFRRGDVLRLVQREG-----	36
human-HEPL	- P KALLARALYD N CPDCSDELA F SRGDILTILEQH-----	35
human-Grb2-N	---ME A IA K YD F KATADDELS F KRGDILKVLNEE-----	31
human-Crk-N	-EE A EYVRALFD F NGNDEEDLP F KKGDILRIRD-----	32
human-PI3K	-AEGYQYRALYD Y KKEREEDID L H L GDILTVNKGSLVALGFSDGQE	43
human-Src	-GGV T TFVALYD Y ES R TETDLS F KKGERLQIVN-----	32
human-GRAF1	-TP F R K AKALYA C K A EHDS E LSFTAGTVFDNVHP-----	33
human-GRAF2	-I R S R KARAVY P CE A EHSS E LSFEIGAFEDVQT-----	33
human-Amph1	-G F LY K VE T L H DFEAANSDELT L RGD V VLVVP S DS-----	35
human-ASAP2	-L K PKRVKALY N (V A D) N PDELT F SEGDV I IVD-----	31
	: . : : : . : .	
human-p130Cas	-TQGLD G WWL--CSL H GR-----QGI-VPGNRL K ILVG	64
human-Nedd9	-TGGLE G WWL--CSL H GR-----QGI-VPGNRV K LLIG	63
mouse-EFS	-AGGLD G W C L--CSL H GQ-----QGI-VPANRV K LLPA	64
human-Abl	-AGGLD G W C L--CSL H GQ-----QGI-VPANRV K LLPA	64
human-HEPL	-V P SE G WW K --CLL H GR-----QGL-APANRLQILTE	63
human-Grb2-N	---CDQ N WY K --AEL N G K -----DGF-IPKNY I EMKPH	58
human-Crk-N	-K P EEQ--WW N -AEDSE G K -----RGM-IPVPY V EKYRP	61
human-PI3K	AR P EEIGWLNGY N ETT G E-----RGD-FPGTY V EYIGR	77
human-Src	--NTEGDWWLA H SLST G Q-----TGY-IPSNY V APSDS	62
human-GRAF1	--S Q EPGWLE--GTL N G K -----TGL-IPENY V EFL--	59
human-GRAF2	--S R EPGWLE--GTL N G K -----RGL-IPQNY V KLL--	59
human-Amph1	EADQDAGWL V --GV K ESDWLQY R D L ATY K GL-FPEN F TRRLD--	74
human-ASAP2	-GEEDQ E WW I --GHID G D-----PGR K GA-FPV S FV H FIAD	63
	* * * *	

Obr. 2.10: Srovnání sekvencí různých SH3 domén s SH3 doménou p130Cas. Proteiny Nedd9, EFS a HEPL patří do stejné rodiny jako p130Cas - N12 a R57 vysvětlují polární charakter jejich vazebného žlábků a jsou spolu s dalšími AK (v závorkách) zodpovědné za vazbu bazické kotvící aminokyseliny ligandu (Wisniewska et al., 2005). Domény s nejpodobnější ligandovou preferencí (ASAP2, GRAF proteiny) překvapivě mají místo asparaginu na pozici 12 cytosin. Sekvence porovnány pomocí algoritmu CLUSTAL W 2.1.

2.1.5.3. Funkce SH3 domény p130Cas a význam jejich interakcí

SH3 doména p130Cas zprostředkovává interakci s mnoha různými proteiny (viz Tab. 2.3), a tak ovlivňuje mnoho funkcí p130Cas (viz Obr. 2.11). Mezi nejvýznamnější patří interakce SH3 domény proteinu p130Cas s kinázami (FAK, PYK2, Ack1) a fosfatázami (PTP1B, PTP-PEST), což poukazuje na pravděpodobnou řídicí roli SH3 domény p130Cas jak v pozitivní, tak i v negativní regulaci tyrosinové fosforylace substrátové domény p130Cas (viz kapitola 2.1.1). Dynamická fosforylace a defosforylace substrátové domény p130Cas se ukázala být klíčová pro podporu buněčné migrace (Brabek et al., 2005; Janostiak et al., 2011; Meenderink et al., 2010). U buněk NP31 exprimujících p130Cas s deletovanou SH3 doménou byla pozorována, navíc k výraznému snížení jeho tyrosinové fosforylace, a tudíž defektu vazby k proteinu Crk, i snížená tvorba aktinových stresových vláken (Tazaki et al., 2010).



Obr. 2.11: Význam interakcí SH3 domény p130Cas. Obrázek nakreslen v programu Adobe Illustrator.

SH3 doména proteinu p130Cas má vliv i na lokalizaci p130Cas v buňce, pravděpodobně přes interakci s kinázou FAK (viz kapitola 2.1.3). Tato interakce je klíčová také pro dynamiku fokálních adhezí a s tím souvisejících dějů, jako je buněčná adheze a migrace (Honda et al., 1999; Tikhmyanova et al., 2010). V naší laboratoři už bylo ukázáno, že fosforylace Tyr12 (číslování myší) v sekvenci ALY₁₂D ruší interakce SH3 domény p130Cas s vazebnými ligandy, včetně kinázy FAK, a že tato modifikace mírně snižuje tyrosinovou fosforylaci substrátové domény p130Cas a překvapivě zvyšuje buněčnou migraci a invazivitu myších embryonálních buněk transformovaných konstitutivně aktivní kinázou Src. Fosforylace Tyr12 byla zároveň důležitá pro regulaci dynamiky buněčných adhezivních struktur, a to jak adhezivních foků, tak i podozómů (Janostiak et al., 2011).

	Interaktor	Vazebný motiv	Citace
SH3 doména p130Cas	FAK/FRNK	✓ A ₇₁₁ PPKPSRP P ₈₇₄ PKKPPRP	(Harte, 1996; Ohba et al., 1998; Polte, 1995).
	PYK2	✓ P ₇₁₃ PPKPSRP P ₈₅₅ PQKPPRL	(Li and Earp, 1997; Ohba et al., 1998)
	PTP-PEST	✓ P ₃₃₃ PPKPPRT	(Garton et al., 1997)
	MICA1	✓ P ₈₂₉ PPKPPRS	(Suzuki et al., 2002)
	CIZ/ZNF384	✓ A ₁₈₇ PPKPPRG	(Nakamoto et al., 2000)
	C3G	✓ A ₂₆₆ PPKPPLP	(Kirsch et al., 1998)
	Vinculin	* A ₈₅₉ PPKPPLP	(Tatárová, dipl. pr. 2012)
	PTP1B	✓ P ₃₀₈ PPRPPKR	(Liu, 1996)
	CD2AP/CMS	* Y ₄₀₉ PKRPEKP	(Kirsch et al., 1999)
	Ack1	* I ₇₄₅ PPRPTRP	(Modzelewska et al., 2006)
	Dynamin1	* V ₈₃₂ PSRPNRA	(Kang et al., 2011)
	Dock180	* S ₁₇₃₄ PLRPQRP	(Hsia et al., 2003)

Tab. 2.3: Souhrn interakčních partnerů SH3 domény proteinu p130Cas. * označuje neověřené sekvence zodpovědné za interakci, ✓ ověřené. Světle zeleně či modře vyznačena centrální nebo kotvící bazická aminokyselina, oranžově kotvící hydrofobní leucin.

2.1.5.3.1. Interakce s kinázami FAK, PYK2, Ack1

Nereceptorová tyrosinová kináza FAK, její příbuzná PYK2 (PTK2B) a duální Tyr-Ser/Thr kináza Ack1 interagují s SH3 doménou proteinu p130Cas, což umožňuje následnou fosforylaci substrátové domény p130Cas stimulující buněčnou migraci ([viz kapitola 2.1.1](#)). Kromě toho jsou tyto interakce důležité pro lokalizaci p130Cas k plazmatické membráně ([viz kapitola 2.1.3](#)).

Kináza FAK se váže k SH3 doméně p130Cas přes dvě vazebné sekvence. První sekvenci, vykazující vyšší afinitu k SH3 p130Cas, představuje polypeptid APPKPSR lokalizovaný mezi aminokyselinovými zbytky 711-717 (číslováno podle lidské FAK). Druhá sekvence PPKPPR se nachází mezi 874-880 (Harte, 1996; Ohba et al., 1998; Polte, 1995). Nasyntetizovaný peptid EAPPKPSRP odvozený od kinázy FAK se váže k SH3 doméně p130Cas s 6 μ M afinitou (Kd). Prodloužení tohoto peptidu o pět aminokyselin na C-konci sílu této vazby třikrát zvýšilo (Wisniewska et al., 2005). Kináza PYK2 sdílí 45 procentní sekvenční identitu s kinázou FAK a s SH3 doménou p130Cas interaguje také přes dvě sekvence: sekvencí P₇₁₃PPKPSRP a P₈₅₅PQKPPRL (Ohba et al., 1998). Právě díky vysoké sekvenční homologii se mohou kinázy FAK a PYK2 v buňce funkčně částečně zastupovat při ztrátě exprese jedné z nich (Sieg et al., 1998). Obě jsou

aktivovány adhezí buňky na složky ECM, jako je například fibronectin. Tato jejich aktivace zároveň zvyšuje stabilitu komplexu s proteinem p130Cas a je závislá na aktivitě kinázy Src (Polte and Hanks, 1997; Sieg et al., 1998). Buněčná adheze na fibronectin může ale i negativně ovlivňovat interakci p130Cas-FAK, a tak regulovat dynamiku sestavování a rozpadu tohoto komplexu. Serinová fosforylace Ser722 v sekvenci kinázy FAK APPKPSRPGYPS₇₂₂ totiž ruší vazbu SH3 domény proteinu p130Cas. Tuto fosforylaci, která způsobuje pokles aktivity FAK, nejspíše vykonává kináza GSK3 β aktivovaná buněčnou adhezí. Kompetice této kinázy se Ser/Thr fosfatázou PP1 určuje výslednou sílu vazby p130Cas s FAK, neboť vazba druhé polyprolinové sekvence FAK na SH3 doménu p130Cas není touto fosforylací ovlivněna (Bianchi et al., 2005; Ma et al., 2001). Během mitózy dochází navíc k extenzivní Ser/Thr fosforylaci obou proteinů (FAK i p130Cas) rušící jejich interakci, ale cílové Ser/Thr nebyly dosud identifikovány (Ma et al., 2001; Yamakita et al., 1999). Kromě toho se ukazuje, že i fosforylace na tyrosinu by mohla regulovat jejich vazbu, neboť fosforylovaný Tyr12 nacházející se ve vazebném žlábků SH3 domény p130Cas ruší interakci s kinázou FAK (Janostiak et al., 2011).

Ack1 patří mezi tyrosinové kinázy, ale překvapivě se povedlo identifikovat Ser242 na proteinu WASP, který Ack1 účinně fosforyluje (Yokoyama et al., 2005). Ack1 interaguje s proteinem p130Cas nezávisle na svojí kinázové aktivitě, vazba buňky na kolagen však tuto interakci stimuluje. Při interakci Ack1 s p130Cas se pravděpodobně uplatňují SH3 domény obou proteinů, neboť jsou tyto domény schopny ve vazebném experimentu navzájem vázat svůj celý protějšek (Ack1 či p130Cas) a delece SH3 domény p130Cas interakci s Ack1 pouze zeslabuje. Kupodivu delece substrátové domény p130Cas velmi výrazně podpořila jejich vazbu, a to nezávisle na stimulaci buněčné adheze na kolagenu. To naznačuje inhibiční vliv substrátové domény na konstitutivní asociaci p130Cas s Ack1. Tato doména p130Cas pravděpodobně blokuje přístupu SH3 doménám Ack1 či p130Cas k příslušným polyprolinovým vazebným sekvencím (Modzelewska et al., 2006).

2.1.5.3.2. Interakce s fosfatázami PTP-PEST, PTP-1B

Tyrosinové fosfatázy PTP-PEST a PTP-1B interagují s SH3 doménou p130Cas, což umožňuje následnou defosforylaci substrátové domény p130Cas. To vede k inhibici buněčné migrace (Garton et al., 1997; Garton et al., 1996; Garton and Tonks, 1999; Liu et al., 1996; Liu et al., 1998).

PTP-PEST se váže s vysokou afinitou k SH3 doméně p130Cas přes svoji sekvenci P₃₃₃PPKPPR nacházející se na C-terminálním konci, zhruba (5-50x) silněji než k jiným SH3 doménám, které také váží polyprolinové sekvence na proteinu PTP-PEST. Cílená mutace klíčového prolinu 337 za alanin pak tuto asociaci s SH3 doménou p130Cas téměř zcela potlačila a zároveň významně snížila účinnost defosforylace substrátové domény proteinu p130Cas. Tato interakce je tedy důležitá pro efektivní defosforylaci p130Cas. Specifitu se dosahuje díky katalytické doméně PTP-PEST. Zajímavé je, že fosfatáza PTP-PEST vykazuje vysokou specifitu k fosforylovanému p130Cas na rozdíl od PTP-1B. Substrátové selektivity PTP-1B je dosaženo její omezenou buněčnou lokalizací (Flint et al., 1997; Garton et al., 1997; Garton et al., 1996).

PTP-1B je fosfatáza asociovaná s endoplazmatickým retikulem a plazmatickou membránou. Váže se k SH3 doméně proteinu p130Cas nerozlišující jeho fosforylační stav. Za tuto interakci zodpovídá sekvence PP₃₀₉PRPPK, neboť mutace prolinů P₃₀₉ a P₃₁₀ za alaniny tuto vazbu ruší (Liu et al., 1996). Fosfatáza PTP-1B defosforyluje substrátovou doménu p130Cas, a tak brání vazbě proteinu Crk. Tím negativně reguluje integrinovou a insulinovou signalizaci (Dadke and Chernoff, 2002; Liu et al., 1998; Takino et al., 2003). Tato fosfatáza ale zároveň také zpřístupňuje SH2 doménu proteinu Crk k vazbě substrátové domény p130Cas tyrosinovou defosforylací Crk u plazmatické membrány na Tyr221, který je v cytosolu fosforylován kinázou Abl, a tak zvyšuje buněčnou migraci (Feller et al., 1994; Takino et al., 2003). Tato defosforylace Crk je umožněna díky interakci SH3 domény proteinu Crk s PTP1B (Liu et al., 1996). Jak je možné vysvětlit tyto dva protichůdné buněčné projevy? Nadprodukce samotné PTP-1B vede k defosforylaci obou proteinů, a ve svém důsledku zabraňuje propojení p130Cas/Crk, tedy snižuje buněčnou migraci. Naopak nadprodukce PTP-1B a Crk nemění fosforylační status endogenního p130Cas, a tedy zvyšuje buněčnou migraci asociací p130Cas s Crk (Liu et al., 1998; Takino et al., 2003). Z toho vyplývá, že PTP-1P preferenčně (s vyšší afinitou) váže a defosforyluje Crk, který pak stericky brání defosforylaci p130Cas vazbou jeho fosforylovaných tyrosinů. S tím koreluje i fakt, že adheze buněk na fibronectin aktivuje nejen kinázy FAK/Src fosforylující Cas, ale i fosfatázu PTP-1B defosforylující preferenčně Crk (Dadke and Chernoff, 2002; Takino et al., 2003). Jinými slovy to, zda bude PTP-1B ovlivňovat buněčnou migraci pozitivně nebo negativně, závisí na správném poměru Crk/PTP-1B/p130Cas v buňce.

2.1.5.3.3. Interakce s GEF proteiny C3G, Dock180

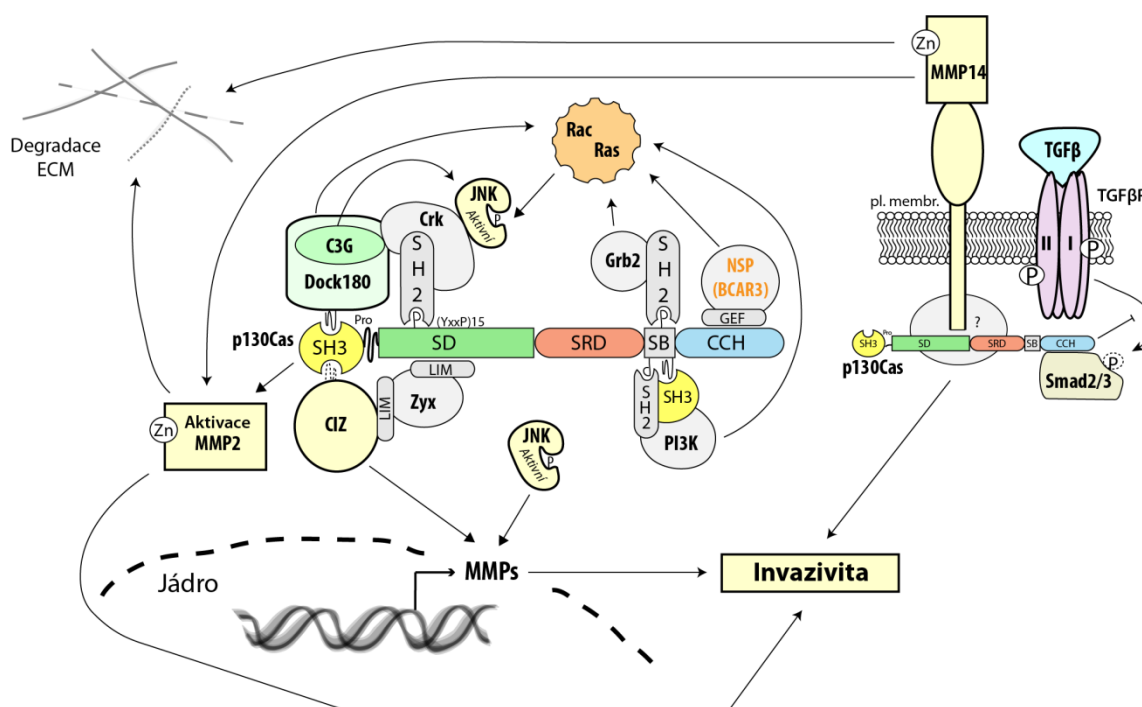
Protein p130Cas je funkčně spjat se svým interakčním partnerem proteinem Crk. Oba mají SH3 doménu lišící se sekvenční specifitou, ale společně váží GTP/GDP výměnné faktory C3G a Dock180 (viz kapitola 2.1.2; Obr 2.2 a 2.3). Protein C3G obsahuje několik sekvencí bohatých na proliny, z nichž většina je zodpovědná za interakci s SH3 doménou proteinu Crk. Sekvence A₂₆₆PPKPPLP se váže ale specificky pouze k SH3 doméně proteinu p130Cas. Tato sekvence překvapivě obsahuje hydrofobní kotvící leucin místo obvyklé pozitivně nabitě aminokyseliny (Kirsch et al., 1998).

SH3 doména proteinu p130Cas váže protein Dock180 a ačkoli tato interakce nebyla potvrzena cílovou mutagenézí vazebného motivu, protein Dock180 ve své struktuře obsahuje sekvenci SP₁₇₃₅LRPQRP, která představuje potenciální vazebné místo SH3 domény p130Cas (Hsia et al., 2003). Fyziologický význam vzájemné interakce p130Cas, Crk a Dock180 pravděpodobně spočívá ve stabilizaci asociace Dock180 s komplexem p130Cas/Crk stejně, jako tomu je u proteinu C3G. Tato přímá vazba proteinu p130Cas s Dock180 či C3G by vysvětlovala fakt, že při zvýšené expresi mutované formy proteinu p130Cas znemožňující interakci s Crk byla blokována aktivace JNK závislá na vazbě buňky na fibronectin, ale ne aktivace JNK stimulovaná proteinem v-Src (Dolfi et al., 1998).

2.1.5.3.4. Interakce s transkripčním faktorem CIZ, invazivita

S buněčnou migrací je funkčně spojena invazivita. Degradace ECM umožňující buňkám invadovat do okolních tkání je pro invazivitu klíčová a ta je zprostředkována činností „matrixových“ metaloproteáz (shrnuto v DeClerck, 2000). SH3 doména proteinu p130Cas zvyšuje buněčnou invazivitu stimulací exprese těchto metaloproteáz (MMP), a to nejen zprostředkovanou aktivací kinázy JNK (viz kapitola 2.1.2), ale i přímou interakcí s transkripčním faktorem CIZ (viz Obr. 2.12). Tento nukleo-cytoplazmatický kyvadlový protein aktivuje transkripci metaloproteáz MMP-1, MMP-3, MMP-7. Kryší protein CIZ/ZNF384 interaguje s SH3 doménou p130Cas přes sekvenci A₁₈₇PPKPPR, zatímco lidský postrádá jeden klíčový prolin a s SH3 doménou p130Cas neinteraguje. Tento nedostatek ale přemostňuje jiný nukleo-cytoplazmatický protein, protein Zyxin, který interaguje s p130Cas a CIZ, a tak tyto dva proteiny propojuje (Janssen and Marynen, 2006;

Nakamoto et al., 2000). Asociace proteinu CIZ s p130Cas vysvětluje transaktivaci promotoru pro MMP-7 při jejich koexpresi. Kromě toho se ale ukázalo, že SH3 doména proteinu p130Cas je také důležitá pro aktivaci metaloproteázy MMP-2 v buňkách transformovaných konstitutivně aktivní kinázou Src (Brabek et al., 2005) a že protein p130Cas asociuje s MMP-14 (MT1-MMP) na vedoucích okrajích buňky, a tak podporuje migraci stimulovanou sphingosin-1 fosfátem (Gingras et al., 2008). Tyto informace potvrzují důležitost proteinu p130Cas, především jeho SH3 domény, pro degradaci extracelulární hmoty.



Obr. 2.12: p130Cas a invazivita. Na zvyšování buněčné invazivity proteinem p130Cas se nepostradatelně podílí jeho SH3 doména (aktivace kinázy JNK, aktivace MMP2, CIZ). Kromě toho p130Cas asociuje na membráně s MMP14, která aktivuje MMP2 a i sama degraduje některé složky ECM. Protein p130Cas také inhibuje TGFβ signalizaci mající primárně na růst a invazivitu inhibiční charakter. *Pozn.: p130Cas podporuje aktivaci JNK kinázy vícero způsoby. Většina vede přes aktivaci GTPáz Rac1 a Ras, u proteinu C3G popsán i jiný na GTPázách nezávislý mechanismus. Kromě toho protein Crk interaguje s JNK a společně s p130Cas pravděpodobně přitahuje JNK k jejímu aktivátoru, kináze MKK4.*

2.1.5.3.5. Interakce s cytoskeletálními proteiny

SH3 doména proteinu p130Cas se ukázala být důležitá pro remodelaci aktinového cytoskeletu (Tazaki et al., 2008), proto lze očekávat interakce SH3 domény p130Cas s cytoskeletálními proteiny. Doposud se povedlo identifikovat interakci s CD2AP, MICA1 a Dynaminem1 (citace viz Tab. 2.3). CD2AP (CMS) patří mezi multifunkční adaptorové molekuly, který zprostředkovává interakci mezi membránovými proteiny a aktinovým cytoskeletem. SH3 doména p130Cas interaguje s jeho centrální polyprolinovou oblastí (Kirsch et al., 1999). Zatímco CD2AP přímo váže F-aktin a přispívá k jeho polymeraci, MICA1 podporuje depolymerizaci F-aktinu a také propojuje proteiny z rodiny Cas s intermediálními filamenty (Bruck et al., 2006; Lehtonen et al., 2002; Suzuki et al., 2002; Zucchini et al., 2011). Za interakci p130Cas s MICA1 zodpovídá úsek P₈₃₀PKPPRS umožňující vysokoafinitní vazbu SH3 domény p130Cas, neboť mutace centrálního lysinu za alanin vazbu ruší (Suzuki et al., 2002).

Za interakci SH3 domény proteinu p130Cas s Dynaminem1 zodpovídá C-koncová doména Dynaminu bohatá na proliny. Jako nejpravděpodobnější vazebné místo se zde jeví sekvence P₈₃₃SRPNRA (Kang et al., 2011). Dynamin patří mezi GTPázy podílející se na internalizaci receptorů EGFR endocytózou a in vitro asociuje s mikrotubuly (Shrnuto v Praefcke and McMahon, 2004). Protein p130Cas naopak stimuluje vytváření makromolekulárních komplexů na plazmatické membráně, které obsahují EGFR, integriny a kinázy Src, a inhibuje internalizaci receptorů EGFR indukovanou ligandem EGF právě přes interakci s Dynaminem. Tato interakce totiž inhibuje fosforylaci Dynaminu1 indukovanou receptory EGFR, která podporuje jejich internalizaci (Kang et al., 2011).

3. Materiál

3.1. Organismy

Esterichia coli

kmen **ER2738 (K12)**: $F' \text{ proA}^+B^+ \text{ lacI}^q \Delta(\text{lacZ}) \text{ M15 } \text{zzf}::\text{Tn10 } (\text{Tet}^R)/\text{fhuA2 } \text{glnV}$
 $\Delta(\text{lac-proAB}) \Delta(\text{hsdMS-mcrB})5 [\text{rk}^- \text{mk}^- \text{McrBC}]$

kmen **BL21**: $F' \text{ ompT } r_Bm_B \lambda\text{DE3 } \text{lysogen}$

Bakteriofág

kmen **M13KE**: $\text{lacZ}\alpha^+$, nesou degenerovanou sekvenci 12 nukleotidů v genomu (součástí fágové knihovny)

Savčí immortalizované buněčné linie:

HEK293FT lidské embryonální buňky izolované z ledviny, transformované adenovirem

HELA lidské nádorové buňky izolované z děložního čípku

MDA-231MB lidské nádorové buňky izolované z nádoru prsu

3.2 Kultivační média

3.2.1 Kultivace bakteriálních kmenů (a fágů)

Na přípravu kultivačních **medií** je používána „miliporová“ voda z přístroje Watrex

LB 10 g/l Universal pepton M66 (MERCK, Německo)
5 g/l Yeast Extract (OXOID, UK)
5 g/l NaCl

YTG 5 g/l Yeast Extract (OXOID, UK)
8 g/l Trypton
5 g/l NaCl
1 % Glukóza

Plotny:

ŽA2 4 % živný agar č. 2 (Imuna, Šarišské Michalany)
po zchlazení < 70 °C
přidat antibiotikum (1:1000)

	Nalít plotny
LB/ IPTG/ Xgal	LB medium 15 g/l Agar po zchladnutí < 70 °C IPTG (1 mM), Xgal (40mg) či 1ml/l zásob. roz. IPTG/xgal Nalít plotny, skladovat ve 4 °C ve tmě
„Agarose Top“	10 g/l Universal pepton M66 (MERCK, Německo) 5 g/l Yeast Extract (OXOID, UK) 5 g/l NaCl 1 g/l MgCl ₂ .6H ₂ O 7 g/l Agaróza

60 % glycerol

Vše sterilizováno v autoklávu 20 min při 121°C.

Zásobní roztoky pro selekci:

Ampicilin (Biotika, SR) 100 mg/ml

Kanamycin (AppliChem, Germany) 50 mg/ml

Tetracyklin-HCl (Sigma) 20 mg/ml (rozpuštěno v 70 % etanolu)

IPTG/xgal: 1,25g IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside), 1g Xgal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) v 25 ml DMF (dimethyl formamide).

Zásobní roztoky skladovány v -20 °C a přidávány do zchladlých médií (cca 50 °C) v poměru 1:1000.

3.2.2 Kultivace savčích buněk

Kompletní médium obsahuje:

RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen)

0,5 % neesenciální aminokyseliny (MEM NEAA; Gibco, Invitrogen)

10 % fetální hovězí sérum (FBS; Sigma)

0,5 - 1 % obecná antibiotika - antimykotika (ATB; Gibco, Invitrogen)

Obecná antibiotika - antimykotika (ATB) obsahují:

10000 µg/ml penicilin

10000 µg/ml streptomycin

25 µg/ml amphotericin

Další používané roztoky při kultivaci savčích buněk:

Zamrazovací roztok 90 % FBS

10 % DMSO (sterilní dimethylsulfoxid)

0,25 % **trypsin-EDTA** (Gibco, Invitrogen):

2,5 g/l trypsin

0,38 g/l kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA)

jetPRIME™ kit pro transfekci buněk (Polyplus transfection):

jetPRIME™ pufr

jetPRIME™ reagens

3.3 Materiál použitý při práci s DNA

3.3.1 Purifikace a izolace DNA

Kit - NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, BRD)

Alkalická metoda:

Alkal. SDS 1 % SDS, 0.2M NaOH

KAc 3 M octan draselný, 2M kys. octová, pH 4,8-5,4

NaAc 3 M octan sodný, pH 5.8

80 % EtOH 80 % etanol, 10 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl pH 8.0

TE 10 mM TRIS-HCl pH 8.0; 0,1 mM EDTA-NaOH

TEG 25 mM TRIS-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA-NaOH, 1 % glukóza

LiCl 10 M LiCl, $\rho=1.275$

Příprava DNA fágů (M13) na sekvenaci (viz metoda Phage display):

TE pufr 10 mM Tris-HCl (pH 8)

1 mM EDTA

PEG/NaCl 20 % polyethylene glycol-8000
 2,5 M NaCl

Vše sterilizováno v autoklávu 20 min při 121°C, skladováno při pokojové teplotě či ve 4 °C.

Jodidový pufr TE pufr
 4 M NaI
 Skladovat ve tmě při pokojové teplotě či ve 4 °C.

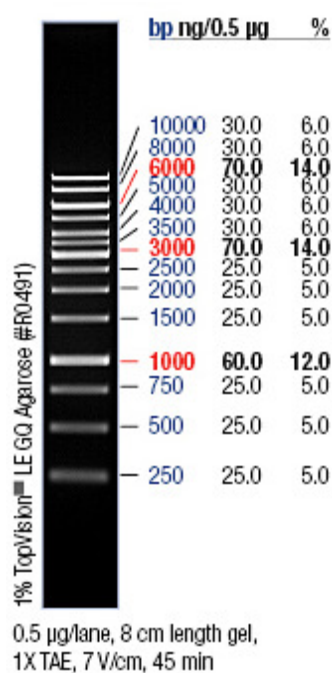
3.3.2 Agarózová elektroforéza

Agaróza Sea Kem a NuSieve (FMC, USA) v poměru 1:1

Pufr TAE 40 mM Tris (pH 8,5)
 20 mM ledová kyselina octová
 2 mM Na₂EDTA

Vzorkový pufr 60 % glycerol
 60 mM EDTA
 0,06 % bromfenolová modř

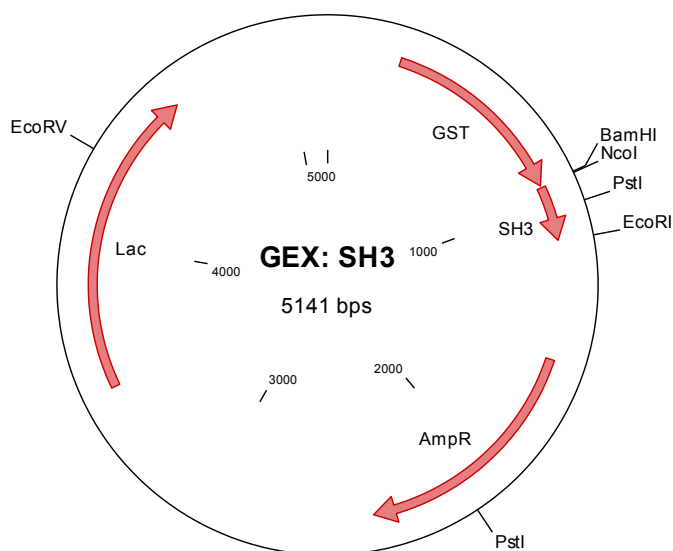
Standard molekulové hmotnosti DNA - GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)



3.3.3 Vektory

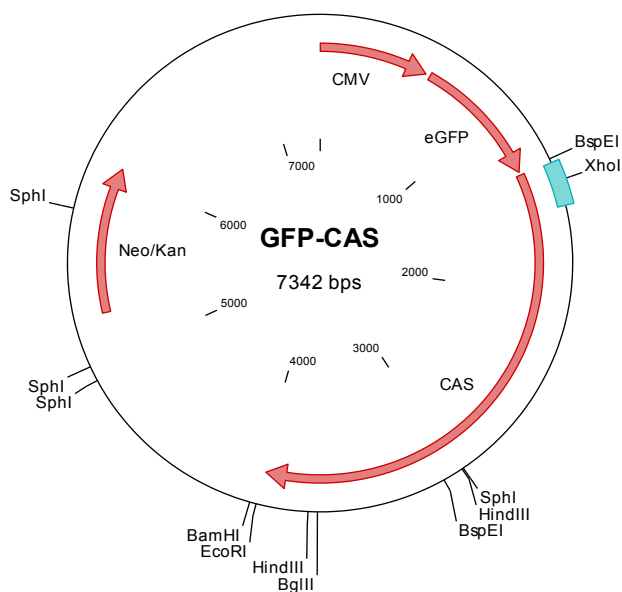
GEX: SH3

Vektor pro expresi GST-SH3 v bakteriích. Připraven na základě **pGEX-2T** (Amersham) vložení myších variant SH3 domén (p130Cas, Src) přes restrikční místa BamHI a EcoRI.



GFP: CAS

Vektor pro GFP fúzní expresi p130Cas v savcích buňkách. Připraven na základě **pEGFP-C1** (Invitrogen) vložení myší cDNA *p130Cas* přes restrikční místa BglII a EcoRI.



3.4 Materiál použitý při práci s proteiny

3.4.1 Purifikace proteinů, analýza relativních afinit, Phage display

HEPES pufr 50 mM HEPES (pH 7,4, upraveno pomocí NaOH)

LB1 pufr 1x pufr HEPES, pH 7,4
100 mM NaCl

LB2 pufr 5 mM HEPES (0,1 x pufr HEPES, pH 7,4)
10 mM NaCl (0,1 x pufr LB1)

TritonX-100 20 % v LB1 pufru

PEG/NaCl 20 % polyethylene glycol-8000
2,5 M NaCl

Alkalické Tris Tris-HCl, pH 9,1

TBS pufr 50 mM Tris-HCl (pH 7,4, upraveno pomocí HCl)
150 mM NaCl

Pozn.: TBS používané na promývání membrán jiné

Vše sterilizováno v autoklávu 20 min při 121°C

TBST pufr 1x pufr TBS + Tween 20 (0,1 – 0,5 %)

Pozn.: TBST odlišný od pufru TTBS koncentracemi solí a Tween 20

Blokovací pufr ELISA 1x TBS pH 7,4
5 mg/ml BSA

Uvolňovací pufr 50 mM Tris, pH 8.0
10 mM GSH
1 mM DTT

Pozn.: pro uvolnění GST-SH3 domén od GSH-sefary, Tris sterilizován v autoklávu, GSH s DTT přidáváno čerstvě

Blokovací pufr P.d. 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,6)
5 mg/ml BSA
0,02 % NaN₃ + sterilizovat filtrací, anebo vždy nový

Eluční pufr	0,2 M glycín-HCl, pH 2,2 1mg/ml BSA <i>Pozn.: Uvolnění fágů od GST-SH3 domén</i>
Substrát ABTS	(2,2'-Azino-Bis(3-EthylbenzThiazoline-6-Sulfonic acid) Diammonium) - Roche
Knihovna fágů pro analýzu Phage Display	- Ph.D. 12 TM Peptide Library Kit, New England Biolabs)
96-jamkové destičky Corning EIA/RIA	(vysoká vazba k hydrofobním molekulám)
Zásobní roztok inhibitorů proteáz MixB	(bakteriální: 1 mg/ml Aprotinin, 5 mg/ml leupeptin, 100 mg/ml Pefabloc) ředění 1000x
1M IPTG	(zásobní 1000x, rozpuštěno v dH ₂ O), sterilizováno filtrací
Glutathione SepharoseTM 4B	GE Healthcare (50 % směs v 20 % Etanolu)
Protein A SepharoseTM 4	GE Healthcare (50 % směs v 20 % Etanolu)

3.4.2 Roztoky na přípravu lyzátů a buněk pro konfokální mikroskop

pufr Nonidet	0,5 % Nonidet P – 40 20 mM HEPES 100 mM KCl sterilizováno v autoklávu 20 min při 121°C 1 mM DTT (přidáván zvlášť čerstvý)
Zásobní roztok proteázových inhibitorů MixM	(savčí: 0,5 mg/ml Aprotinin, 0,5 mg/ml leupeptin, 12,5 mg/ml Pefabloc) ředění 100x
Kit na stanovení proteinové koncentrace	- Dc Protein Assay kit (Bio-Rad, USA)
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , pH upraveno na 7,3
PFA	zásobní 1x HEPES pufr

8 % paraformaldehyde
Ředění na 4% PFA v PBS

Blokovací roztok: 3 % BSA v PBS

Permeabilizační roztok: TritonX-100 0,3 % v Mg-PBS

DABCO – 1,4-diazabicyclo(2.2.2)octane, Sigma

Fibronectin (Serva) - 10µg/ml – na sklíčko 100µl, zásobný roztok 1 mg/ ml (Serva)

Alexa Fluor **488 phalloidin** – Invitrogen

Montovací médium: 6 g glycerol

2,4 g mowiol

6 ml dH₂O

12 ml pufru (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 1 mM
MgCl₂, pH 8,3)

3.4.3 SDS-PAGE elektroforéza a Western blot

Protogel 30 % akrylamid
0,8 % N, N' - methylenbisakrylamid
Sterilizováno filtrací, skladované v tmě při 4°C

4xTris/SDS pH 8,8 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
0,4 % SDS
Sterilizováno filtrací, skladované v tmě při 4°C

4x Tris/SDS pH 6,8 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
0,4 % SDS
Sterilizováno filtrací, skladované v tmě při 4°C

5× Laemmli pufr 0,35 M Tris-HCl, pH 6,8
10 % SDS
40 % glycerol
0,012 % bromfenolová modrá
ředit na nižší koncentrace pomocí **4x Tris/SDS pH 6,8**

DTT (Dithiothreitol) 1 M, 1:20 až 1:100

TEMED – N, N, N9, N9,-tetra-methyl-ethylenediamine (Serva)

10 % APS (Amonium persulfát) – NH₄S₂O₈ (Sigma)

SDS-PAGE pufr 25 mM Tris (pH 8,3)
 190 mM glycin
 0,1 % SDS

Barvící roztok 20 % metanol
 10 % kys. Octová
 0,114 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, USA)

Odbarv. roztok 20 % metanol
 7 % kys. octová

Transferový pufr 25 mM Tris
 192 mM glycin
 20 % metanol
 0,05 % SDS

TBS 20 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 500 mM NaCl

TTBS 0,05 % Tween 20 (Serva) v **TBS**

Pozn.: TTBS odlišný od pufru TBST koncentracemi soli a Tween 20

Blokovací roztok:

4 % BSA (Milipore) v TBS – blokování 50-60 minut při 37°C

3 % mléko (Sigma) v TBS – blokování 30 minut při pokojové teplotě

Pozn.: Tento roztok je odlišný od blokovacího pufru používaného při analýze Phage display a analýze relativních afinit

Roztok pro ředění primární a sekundární protilátky:

1 % BSA (Milipore) v TTBS

1 % mléko (Sigma) v TTBS

Ponceau S 0,1 % ponceau
 5 % kys. octové

Blotovací pufr 25 mM Tris
 192 mM glycin
 20 % metanol
 0,05 % SDS

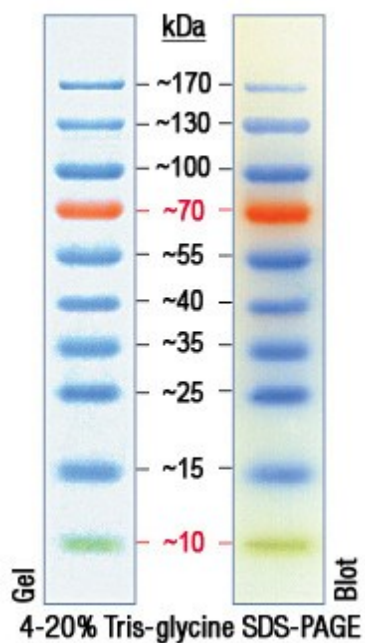
Stripovací pufr 4,7 µl 2-mercaptoetanol (14,7 M)
 20 ml 10 % SDS roztoku
 3,9 ml roztoku 1M TrisHCl pH 6,8 (**4x Tris/SDS pH 6,8**)
 76 ml dH₂O

Souprava **Super Signal West Pico Chemiluminiscent Substrate** (Pierce Biotechnology):

Roztok luminolu s enhancerem

Roztok stabilního peroxidu

Standard molekulové hmotnosti proteinů - PageRuler™ Prestained Protein Ladder
(Fermentas)



Přehled použitých protilátek:

Protilátka – 1st [▪] , 2nd [▫]	Specifikace	Výrobce	Ředění	Velikost na gelu
▪ Anti-p130Cas	Mouse monoclonal	BD Transduc. L.	1:1000	130 kDa
▪ Anti-FAK(C20)	Rabbit polyclonal	Santa Cruz	1:1000	125 kDa
▪ Anti-Src (v-Src)	Mouse monoclonal	Calbiochem	1:500 (1:40)	60 kDa
▪ Anti-GFP (FL) B	Rabbit	Santa Cruz	1:1000	27 kDa
▪ Anti-GFP	Mouse IgG _{2a}	Invitrogen	1-2 µg *	27 kDa
▪ Anti-CEP2 (CDC42EP2)	Mouse monoclonal	Sigma	1:1000	24 kDa
▪ Anti-PKN3	Rabbit	Novus Biolog.	1:2000	99,5 kDa
▪ Anti-M13 HRP-conjug.	Rabbit	GE Healthcare	1:5000	
▫ Anti-rabbit IgG-HRP	Goat	Santa Cruz	1:3000	
▫ Anti-rabbit IgG-HRP	Goat	Pierce	1:2500	
▫ Anti-mouse IgG-HRP	Goat	Pierce	1:2500	
▫ Anti-mouse IgG-HRP	Rabbit	Jackson Im. R.	1:3000	

* Tato protilátka byla používána na imunoprecipitaci, 1-2 µg na reakci. Na imunofluorescenci použity protilátky anti-Paxillin (mouse, BD transduc. L.), anti-PKN3 (rabbit) v poměru 1:100 a sekundární protilátky Alexa Fluor 546 anti-rabbit (Molecular Probes) a Alexa Fluor 633 anti-mouse (Molecular Probes) 1:1000.

4. Metody

4.1. Purifikace a izolace plazmidové DNA

Alkalická metoda

pufry: Alkal. SDS; KAc; 80% EtOH; TE; TEG; LiCl ([viz materiál 3.3.1](#))

médium: LB ([viz materiál 3.2.1](#))

1. Den (odpoledne)

- Zaočkujeme 10-50 ml temperovaného LB média s příslušným selekčním antibiotikem (100 µg/ml; pGEX nese rezistenci na ampicillin, pIRES na kanamycin) bakteriemi (z bakteriální konzervy *) nesoucí požadovaný plazmid do 100-250 ml Erlenmayerovy baňky. *Volitelně lze bakterie s příslušným plazmidem nejdříve den předem zaočkovat na plotnu se živným agarem a příslušným antibiotikem pro získání oddělené kolonie a vyšších plazmidových výtěžků - kultivace přes noc při 37 °C.*
- Erlenmayerovu baňku umístíme do třepačky a třepeme při 37 °C přes noc (~180 rpm > 16 h)

2. Den (ráno)

- kulturu ochladíme v ledové lázni, přelijeme do 50 ml centrifugační zkumavky a stočíme (Jouan MR 22i – výkyvný rotor, 3 000 g, 20 min, 0°C).
- Sediment dokonale resuspendujeme do x ml TEG (*X vypočítáme dle výchozího objemu kultury následovně: 1 ml při 10 ml kultury, 2-4 ml při 50 ml kultury*) a inkubujeme 30 min v ledové lázni.
- Zkumavku vyjmeme z ledové lázně, přidáme 2·X ml alkalického SDS, promícháme a inkubujeme 5 minut. *Buňky lyzují, suspenze se projasní, výrazně stoupne viskozita.*
- Zkumavku opět přeneseme na led a přidáme 1,5·X ml KAc, promícháme a inkubujeme dalších 30-60 minut na ledu. *Z roztoku vypadne bílá sraženina.*
- Směs převedeme do polypropylénových zkumavek a sraženinu usadíme centrifugací (Jouan MR 22i – úhlový rotor, 14 000 g, 20 min).
- Supernatant převedeme do 15 ml kalibrované zkumavky, dokonale smísíme s 0.6 objemu isopropanolu a ihned centrifugujeme (Jouan MR 22i – výkyvný rotor, 3000 g, 5 min).

- Supernatant slijeme, sediment osušíme, rozpustíme v 300 ml miliporové vody a přeneseme do mikrozkušavky. Objem odměříme, dokonale smísíme se stejným objemem 10 M LiCl a inkubujeme v - 20 °C cca 60 minut (- 80 °C, 15 min).
- Sraženinu odstraníme 5-ti minutovou centrifugací ve stolní mikrocentrifuze (Hettich MIKRO 20, 13 000 g) a supernatant převedeme do čisté mikrozkušavky.
- Plazmidovou DNA vysrážíme z roztoku jedním objemem 96% etanolu 60 min při - 20 °C (- 80 °C, 15 min).
- Sraženinu DNA usadíme centrifugací (Hettich MIKRO 20, 13 000 g, 5 min), sediment 2-3x opláchneme 80% EtOH, vysušíme a rozpustíme ve 100 µl miliporové H₂O (nebo v TE pufru). Kvalitu izolace a množství DNA zjistíme elektroforeticky a změřením absorbancí na NanoDropu 2000 (absorbancí DNA při 260 nm, proteinů při 280 nm).

* Příprava bakteriální konzervy:

1 ml narostlé bakteriální kultury (LB médium) s požadovaným plazmidem (*klon bakterie pozitivní na transformaci plazmidem*) stočíme (Hettich MIKRO 20, 4 000 g, 2 min), sediment promyjeme pufrem LB2 ([viz materiál 3.4.1](#)) a resuspendujeme v 60 % glycerolu (výsledný 30 % glycerol). Konzervy skladujeme při -80 °C.

Izolace plazmidové DNA pomocí nucleoSpin® Plasmid

Pufry součástí kitu: A1, A2, A3, AW, A4, AE ([viz materiál 3.3.1](#))

médium: LB ([viz materiál 3.2.1](#))

1. Den (odpoledne)

- Zaočkujeme kulturu E. coli (max. 5 ml) s daným plazmidem do LB média s příslušným selekčním antibiotikem (pGEX nese rezistenci na ampicillin, pIRES na kanamycin).
- Erlenmayerovu baňku či skleněnou zkušavku umístíme do třepačky a třepeme při 37 °C přes noc (~180 rpm, >16 h)

2. Den (ráno)

- Kulturu převedeme do centrifugační zkušavky a centrifugujeme (Jouan MR22i; 13 000 g, 30 s). Odstraníme supernatant.
- Pelet resuspendujeme v 250 µl roztoku A1.

- Přidáme 250 µl roztoku A2. Jemně promícháme otáčením zkumavky a inkubujeme maximálně 5 minut při pokojové teplotě. *Buňky lyzují, suspenze se projasní, výrazně stoupne viskozita.*
 - Přidáme 250 µl roztoku A3 (pro zastavení lyze). Jemně promícháme a centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 13 000 g, 10 min). *Vyprecipituje bílá sraženina.*
 - Kolonku NucleoSpin Plasmid umístíme do sběrné 2 ml mikrozskumavky, nanese supernatant z předchozího kroku a centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 13 000 g, 1 min), poté odstraníme tekutinu ze sběrné mikrozskumavky.
 - *Pro zbavení se buněčných nukleáz lze fakultativně nanést na kolonku 500 µl roztoku AW předeřátého na 50°C a centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 13 000 g, 1 min).*
 - Na kolonku nanese 600 µl roztoku A4 a opět centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 13 000 g, 1 min).
 - Po odstranění roztoku ze sběrné mikrozskumavky zopakujeme centrifugaci 2 min. pro dokonalé odstranění zbytků etanolu (Hettich MIKRO 20, 13 000 g).
 - Kolonku umístíme do čisté 1,5 ml mikrozskumavky, přidáme 30-50 µl roztoku AE, inkubujeme 1 min při pokojové teplotě a poté centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 16 000 g, 1 min). Eluci lze rovněž provést do TE pufru nebo do deionizované vody. Množství DNA zjistíme změřením absorbance vzorku na NanoDropu (280 nm).
- Tento postup lze použít i pro **purifikaci plazmidů** získaných alkalickou metodou (*hodně RNA*)
- K plazmidům (*ne víc než je kapacita kolonek kitu*) přidáme 250 µl roztoku A1 a pokračujeme stejně jako u izolace plazmidů z kultury

4.2. Elektroforéza DNA v agarózovém gelu

Materiál: Agaróza, pufr TAE, vzorkový pufr, Standard molekulové hmotnosti DNA ([viz materiál 3.3.2](#))

- Elektroforézu vykonáváme v aparátu pro horizontální gelovou elektroforézu v pufru 1x TAE. Délka gelu je 6-10 cm a tloušťka 3-5 mm, vzdálenost elektrod 14 cm.

- Použijeme 1x TAE pufr pro přípravu 1-2 % agarózového gelu. Pro dělení fragmentů větších než 800 bázových párů (bp) používáme 1 % agarózový gel, pro dělení kratších fragmentů používáme 2 % agarózový gel.
- Práškovou agarózu v pufru zahříváme, dokud se kompletně nerozpustí. Vypařenou vodu doplníme a necháme roztok agarózy zchladnout na 45-50 °C.
- Složíme aparaturu, přidáme hřebínek pro vytvoření požadovaných jamek a nalijeme rozpuštěnou agarózu (tuhne ~ 30 min)
- Necháme ztuhnout gel, poté převrstvíme pufrem TAE.
- Připravíme si vzorky přidáním vzorkového pufru (obvykle 1/5 celkového objemu 6x vzorkového pufru)
- Do jamek nanese vzorky, obsahující 10 ng – 2 µg DNA. Do jedné jamky přidáme DNA marker.
- DNA necháme rozdělit při napětí v rozmezí 0,5-10 V/cm.
- Po skončení gel obarvíme v roztoku ethidium bromidu (0,5 µg/ml) po dobu 20 min. a pak omyjeme v dH₂O. Gel prozkoumáme pod UV lampou a fotografujeme s červeným filtrem v procházejícím ultrafialovém (UV) záření (300-310 nm). Snímky exponujeme 2,5 až 4 sekundy (digitální fotoaparát Kodak DC290 Zoom).

4.3. Kultivace tkáňových kultur

4.3.1. Pasážování lidských buněčných linií HELA, MDA-231MB

Roztoky: trypsin, médium RPMI 1640 ([viz materiál 3.2.2](#))

Savčí buňky jsou standardně kultivovány v termostatu při 37 °C a 5 % CO₂ na miskách pro tkáňové kultury (Ø 60 mm nebo Ø 100 mm). Pasážování provádíme zpravidla po 2 až 4 dnech v závislosti na konfluenciisky. Na malé misce (Ø 60 mm) kultivujeme buňky v 4-5 ml média, na velké misce (Ø 100 mm) v 10 ml média. Kulturu pravidelně kontrolujeme pod mikroskopem (Nikon Eclipse TS 2000), abychom včas odhalili případnou kontaminaci.

- Médium a trypsin si vytemperujeme na teplotu 37 °C vložením do vodní lázně po dobu 15 min.
- Z misky odsajeme médium a přidáme trypsin (na malou misku 0,5 ml; na velkou misku 1 ml) a celý povrch opláchneme krouživým pohybem. Trypsin odsajeme a nahradíme novým trypsinem ve stejném objemu.

- Trypsin necháme působit 4-6 minut, dokud se buňky neoddělí ode dna misky.
- Aktivitu trypsinu zastavíme dodáním kompletního média RPMI 1640 (na malou misku 2 ml; na velkou misku 3-5 ml) a dokonale resuspendujeme pipetou agregáty buněk.
- Na novou misku s připraveným kompletním médiem přeneseme požadovaný objem buněčné suspenze - na malou misku 0,4 ml suspenze k 4 ml nového média; na velkou misku 1 ml suspenze k 9 ml média.

4.3.2. Příprava stabilátů buněčných linií

Roztoky: trypsin, médium RPMI 1640, zamrazovací roztok ([viz materiál 3.2.2](#))

Pro přípravu stabilátů z dané savčí linie kultivujeme buňky na velkých miskách (Ø 100 mm) až do dosažení úplné konfluence. Z jedné velké misky pak lze připravit do 1,5 ml mikrozkušavek Nalgene dva stabiláty buněk.

- Z misky odsajeme médium, opláchneme 1 ml trypsinu a opět odsajeme.
- Na misku přidáme 1 ml nového trypsinu, přeneseme do termostatu a necháme působit po dobu 2–6 minut.
- Působení trypsinu zastavíme přidáním 4 ml kompletního média, resuspendujeme a buněčnou suspenzi přeneseme do 15 ml plastové zkumavky Falcon a centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min)
- Opatrně odsajeme médium, přidáme 1-1,5 ml zamrazovacího roztoku, důkladně resuspendujeme a rozplníme do zamrazovacích mikrozkušavek Nalgene.
- Mikrozkušavky umístíme do nádoby s isopropanolem, uložíme do -70 °C a druhý den mikrozkušavky uložíme do kontejneru s tekutým dusíkem.

4.3.3. Rozpěstování stabilátů buněčných linií

Roztoky: trypsin, médium RPMI 1640 ([viz materiál 3.2.2](#))

- Zkušavku s buňkami vyjmeme z kontejneru s tekutým dusíkem a přenášíme na ledu.
- Ve vodní lázni při 37 °C necháme buněčnou suspenzi v mikrozkušavce roztát (1-2 minuty) a poté ji přeneseme k 9 ml vytemperovaného kompletního média v 15 ml plastové zkumavce Falcon.

- Buněčnou suspenzi v médiu centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min) a supernatant opatrně odsajeme.
- Přidáme 5 ml nového kompletního média, resuspendujeme, přeneseme na připravenou misku s 5 ml média a zkontrolujeme pod mikroskopem.

4.4. Transfekce buněk HELA a MDA-231MB

Roztoky: **jetPRIME™** kit ([viz materiál 3.2.2](#))

Pro transfekci používáme plazmidovou DNA přečištěnou přes kolonku komerčního kitu **NucleoSpin® Plasmid**, jejíž koncentraci jsme předtím změřili na spektrofotometru (Shimadzu UV 1650 PC).

Na lyzáty:

- Buňky HELA nebo MDA-231MB necháme narůst na malé misce s konfluencí 60 - 80 %. *Pozn.: Pro transfekci kitem jetPRIME™ není třeba použít médium bez séra*
- Do 200 µl pufru JetPRIME™ přidáme 2-4 µg DNA (0,5 ml centrif. Zkumavka) a vortexujeme 10 s.
- Přidáme ke vzorku 4- 6 µl reagens JetPRIME™, vortexujeme 10 s a pak necháme inkubovat 10 minut při pokojové teplotě.
- Směs přidáme k buňkám a jemně promícháme s médiem.
- Buňky po 48 hodinách zlyzujeme

Na imunohistochemické barvení buněk:

- Buňky HELA nebo MDA-231MB vysejeme do jamek 12-ti jamkové destičky s vloženými krycími sklíčky (mohou být s fibronectinem) na velmi nízkou konfluenci 5-15 %.
- Po přisednutí buněk na dno jamek si připravíme směs 75 µl pufru JetPRIME™ se 0,75-1 µg DNA v 0,5 ml centrif. zkumavce a vortexujeme ji 10 s.
- Přidáme ke vzorku 1,5-2 µl reagens JetPRIME™, vortexujeme 10 s a pak necháme inkubovat 10 minut při pokojové teplotě.
- Směs přidáme k buňkám a jemně promícháme s médiem
- Po 48 hodinách pracujeme dále s buňkami narostlými na krycích sklíčkách ([viz metoda 4.14](#))

4.5. Příprava proteinových lyzátů ze savčích buněk

Roztoky: PBS, pufr Nonidet, proteázové inhibitory MixM ([viz materiál 3.4.2](#))

Lyzáty ze savčích buněk připravujeme nesterilně a na ledu (případně v chladové místnosti).

- Velkou misku se 100 % konfluencí buněk (či malou misku s transfekovanými buňkami) přeneseme z termostatu na led, necháme cca 5 minut ochladit a nesterilně odsajeme médium.
- Misku 2x opláchneme 5 ml vychlazeným 1x PBS a odsajeme.
- Na misku přidáme 1 ml vychlazené směsi lyzačního pufru Nonidet a proteázových inhibitorů (1:100). Necháme lyzovat 12-15 minut při 0-4 °C na překlápěcí třepačce (Biosan, MR-1).
- Buňky z povrchu misky seškrábneme škrabkou, převedeme do mikrozkušavky a protahujeme 10 - 12 x injekční stříkačkou s jehlou 21G dokud není suspenze čirá a bez buněčných agregátů.
- Suspenzi centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5417R, 11 000 g, 20 min, 0 °C).
- Po centrifugaci odsajeme opatrně supernatant, převedeme do nové mikrozkušavky a odebereme aliquot 50 µl pro stanovení proteinové koncentrace. Lyzáty zamrazíme v -20 °C.

4.6. Afinitní purifikace GST-fúzních proteinů

Roztoky: YTG médium, Ampicilin, LB1 pufr, LB2 pufr, HEPES pufr, inhibitory proteáz MixB (1:1000), 1M IPTG, TritonX-100 v LB1 pufru, Glutathione SepharoseTM 4B, Uvolňovací pufr ([viz materiál 3.4.1](#)), DTT, pufr Laemmli ([viz materiál 3.4.3](#))

Pozn.: Tuto purifikaci lze provádět z bakteriální kultury narostlé v 50 ml média YTG (pro „pull down“ a analýzu Phage display) či pro větší výtěžek ze 125 ml (pro analýzu relativních afinit a EC50).

- A) SH3 domény izolované z 50 ml kultury purifikujeme pomocí 120 µl 50 % GSH-sefarózy promyté od etanolu v centrifugační zkumavce, viz dále.
- B) SH3 domény izolované ze 125 ml kultury purifikujeme pomocí 400 µl 50 % GSH-sefarózy přes kolonku, viz dále.

Začátek je pro oba typy purifikace shodný:

- Zaočkujeme bakterie (kmen BL21) s pGEX plazmidem nesoucím jednotlivé varianty SH3 domény p130Cas a kinázy Src (WT, YE, YF, samotná GST) do 20 (50) ml YTG media s Ampicilinem a necháme třepat ve třepačce přes noc při 37 °C (180 rpm).
- Druhý den ráno (kultura by měla mít OD mezi 1,4 - 2,4, měřeno proti čistému YTG médiu) zaočkujeme z inokula na OD 0,4 do 40 (125) ml čerstvého média YTG s přidaným ampicilinem. Necháme třepat na třepačce 2,5 hodiny při 37°C (180 rpm).
- Po této době odebereme 1ml kultury na SDS-PAGE vzorek¹ pro negativní kontrolu před nárůstem indukovatelného proteinu (SH3-GST fúzního proteinu). Tento vzorek zpracujeme viz*

* vzorek centrifugujeme na stolní centrifuze (Hettich MIKRO 20, 4000 g, 2 min.). Opláchneme LB2 pufrém, poté resuspendujeme v 100µl - 1 ml LB1 pufru.

- K zbytku 40 (125) ml kultury přidáme IPTG (výsledná koncentrace 1 mM) a tím indukujeme expresi fúzního proteinu z pGEX plazmidu.
- Kulturu necháme opět růst na třepačce při 180 rpm, 1,5 hod při 37°C (OD by měla být po 1,5 hod. v rozmezí 1,0 - 2,3)
- Odebereme 1 ml vzorek² pro SDS-PAGE (pozitivní kontrolu) a zpracujeme viz*
- Ochladíme kulturu na ledu a převedeme do 50 (250) ml centrifugačních zkumavek
- Centrifugujeme 10 min, 3000g při 4°C (Jouan MR22i; výkyvný rotor; větší objem v MLW K26D, 4500 rpm)
- Sediment resuspendujeme v 40 (125) ml pufru LB2 a opět centrifugujeme 10 min, 3000 g při 4°C (Jouan MR22i; výkyvný rotor; větší objem v MLW K26D, 4500 rpm)
- Odstraníme supernatant a buněčný pelet resuspendujeme v 2 (6) ml LB1 pufru s přidanými inhibitory proteáz
- Suspenzi lyzujeme pomocí přístroje French-press (objem do 2 ml pomocí malého válce s hodnotou tlaku 900 – poloha páky „Med“, objem nad 2 ml (až 20 ml) pomocí velkého válce s hodnotou tlaku 1200 – poloha páky „high“)
- Přidáme pufr 20 % Triton X-100 v LB1 s přidanými inhibitory proteáz MixB na výslednou koncentraci tritonu 1 %.

- Inkubujeme 25 min při 0 °C, nebo preferenčně přes noc při -20 °C.
- Lyzát přeneseme do mikrozkušavek (či velkých polypropylenových 50 ml zkumavek s kulatým dnem) a centrifugujeme 15 min, 13000 g při 0 °C (Eppendorf Centrifuge 5417R či Jouan MR22i – úhlový rotor)
- Supernatant převedeme do nových zkumavek

A) Purifikace ve zkumavce

- Odebereme 120 ul 50 % GSH-sefarózy na vzorek ze zásobní dózy
- GSH-sefarózu 3 x promyjeme 1 ml pufrém LB1 s přidávanými inhibitory proteáz (Eppendorf Centrifuge 5417R, 1000 - 1500 g, 2 min, 0 °C)
- Vytvoříme 50 % suspenzi sefarózy přidáním 60 ul LB1 pufru s inhibitory proteáz
- 120 ul promyté 50 % sefarózy přidáme k bakteriálnímu lyzátu
- Inkubujeme 1 hod. při 4°C na rotátoru
- Centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5417R, 1000 - 1500 g, 2 min, 0 °C)
- Supernatant odstraníme a sediment promyjeme 3 x v LB1 pufru s inhibitory proteáz (*stále na ledu, vhodné použít hamiltonku*)
- Připravíme 50 % suspenzi sefarózy přidáním 60 ul pufru LB1 s inhibitory proteáz
- Odebereme vzorek³ 10 ul sefarózové suspenze pro kontrolu purifikace na SDS-PAGE
- Ze zbytku sefarózové suspenze vytvoříme proteinové konzervy přidáním 120 ul 60 % glycerolu a skladujeme při -20 °C

B) Purifikaci přes kolonku provádíme v chladové místnosti (při 4 °C)

- Upevníme kolonku (se sítkem z inertního materiálu menším než je sefaróza) ke stojanu
- Napipetujeme do kolonky 400 ul GSH-sefarózy
- Sefarózu promyjeme od etanolu 6 ml LB1 pufru s přidávanými inhibitory proteáz
- Do kolonky k sefaróze přidáme bakteriální lyzát (6 ml)
- Kolonku promyjeme 2 x 6 ml LB1 pufru s přidávanými inhibitory proteáz
- Pod kolonku upevníme jímací mikrozkušavku a do kolonky napipetujeme 1,5 ml uvolňovacího roztoku (Tris pH 8.0, 10 mM GTH, 1 mM DTT).

- Odebereme vzorek³ 10 μ l prokapaného roztoku pro kontrolu purifikace na SDS-PAGE
- Do prokapaného roztoku v mikrozkuhavce můžeme dodatečně přidat inhibitory proteáz a skladujeme v lednici maximálně 1 týden. Uvolňovací roztok si také ponecháme (jako blank) pro stanovení koncentrace vypurifikovaných SH3 domén (pomocí mol. absorpčního koeficientu viz 4.7.3)

Příprava vzorků na SDS-PAGE elektroforézu:

- Z kontrolních vzorků^{1,2} odebereme 10 μ l a přidáme 50 μ l 2 x laemli s DTT (1:20)
- Ke kontrolnímu vzorku³ čistoty purifikace přidáme 50 μ l 2 x laemli s DTT (1:20)
- Vzorky^{1,2,3} povaříme na bločku 10 min při 95 °C a 2 min při 100 °C, poté můžeme vzorky nanášet na SDS-PAGE gel, a ověřit tak úspěšnost purifikace SH3 domén.

4.7. Stanovení koncentrace proteinů

4.7.1. Folinova metoda

Roztoky: souprava D_c Protein Assay, (viz materiál 3.4.2).

Koncentrace proteinů ve vzorcích ze savčích buněk byla stanovována kolorimetricky s využitím soupravy D_c Protein Assay (Bio-Rad, USA):

- Připravíme si ředící řadu hovězího sérového albuminu (BSA) následujícím způsobem (viz tabulka):

BSA 2 mg/ml (μ l)	Pufr Nonidet (μ l)	Výsledná koncentrace BSA (μ g/ml)
0	50	0
5	45	200
10	40	400
20	30	800
37,5	12,5	1500

- Přidáním 20 μ l roztoku S do 1 ml roztoku A (1 μ l S na 50 μ l A) si připravíme roztok A'.
- Do mikrozkuhavek pak pipetujeme 125 μ l A' a 25 μ l standardu ředěného pufrém Nonidet, anebo 12,5 μ l lyzátu (z odebraného 50 μ l aliquotu lyzátu, anebo odebereme 25 μ l z 25 μ l lyzátu smíchaného s 25 μ l pufru Nonidet)

- Do každé mikrozkušavky dodáme 1 ml roztoku B, krátce zamícháme na vortexu a ponecháme 15 min. ve tmě.
- Po 15 min. změříme na spektrofotometru absorbanci vzorků při 750 nm (Schimadzu UV 1650 PC; takto připravené vzorky jsou stabilní 2 h, absorbanci lze měřit i později).
- Ze změřených dat standardů o známé koncentraci vytvoříme graf závislosti absorbance na koncentraci. Dopočítáme koncentraci proteinů v našich lyzátech a upravíme koncentraci ve všech vzorcích na srovnatelnou hladinu pomocí ředění pufrem Nonidet.

4.7.2. Denzitometricky z gelu

Roztoky: DTT, pufr Laemmli, BSA ([viz materiál 3.4.3](#))

Vytvoříme si ředící řadu standardu BSA v rozmezí 1-10 µg (po 10 µl, pufr TBS či PBS). Odebereme 10 µl purifikovaných SH3 domén. K těmto vzorkům a standardům přidáme 2 µl 6x laemmli s DTT (bez povaření) a nanese na 10 % gel pro SDS-PAGE elektroforézu. Z obarveného SDS-PAGE gelu (a následně odbarveného) vyhodnotíme na denzitometru (Image Quant) intenzitu proužků analyzovaných proteinů a koncentrační řady standardu BSA (Sigma). Koncentrace proteinů pak odečteme z kalibrační křivky sestavené z naměřených hodnot odpovídajícího množství BSA.

4.7.3. Výpočet přes molární absorpční koeficient

Roztoky: Voda (blank), Uvolňovací pufr (pro odečtení absorbance; *ze stejného dne izolace domén*; [viz materiál 3.4.1](#))

Koncentraci purifikovaných domén SH3 můžeme stanovit pomocí znalosti molárního absorpčního koeficientu (ϵ) a absorbance vzorku ve vodě při 280 nm. ϵ určíme pomocí stránek <http://web.expasy.org/protparam/>, jež předpovídají ϵ na základě aminokyselinové sekvence. Pro převod molární a hmotnostní koncentrace lze použít program http://molbiol.ru/eng/scripts/01_04.html.

Mol. konc. = $A / (\epsilon * d)$; Hm. konc. = Mol. konc. * MW * V [množství gramů v 1 ml]

A...Absorbance při 280 nm

E...Molární absorpční koeficient

d...tloušťka kyvety (1 cm)

MW...Molekulová hmotnost

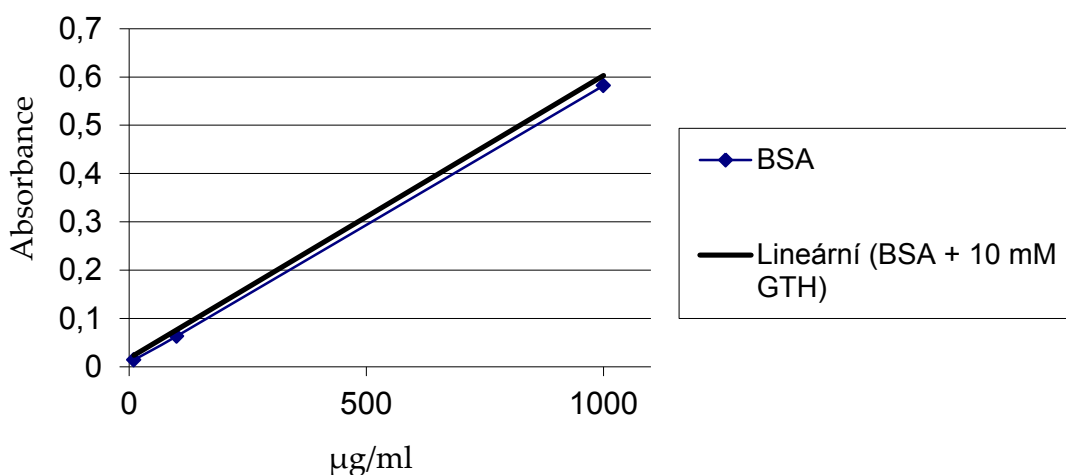
V...Objem

$\epsilon_{\text{P130Cas SH3 + GST}} = 58500$ (molekul. hmotnost 35 191 Da)

$\epsilon_{\text{Src SH3 + GST}} = 59900$ (molekul. hmotnost 33 496,4 Da)

$\epsilon_{\text{GST}} = 57000$ (molekul. hmotnost 32 791 Da)

- Odebereme 100 μl vzorku domén a přidáme do 900 μl H_2O (ředění 10x).
- V přístroji Shimadzu UV 1650 PC nastavíme u kyvety s H_2O hodnotu absorbance při 280 nm = 0 (blank). Pak měříme vzorky a 1 ml uvolňovacího pufru.
- Uvolňovací roztok odečteme od hodnoty vzorků, abychom dostali reálnou hodnotu (absorbance BSA roste lineárně s BSA+ 10 mM GSH, 1mM DTT; viz graf 4.1)



Graf 4.1: Lineární korelace absorbance BSA s BSA + 10 mM GSH (glutathion součástí uvolň. roztoku). Graf vytvořen v programu Microsoft Excel.

Výpočet:

Koncentrace $\text{p130CasSH3-GST} = ((A_{\text{SH3}} - A_{\text{uvolň. roz.}}) / 58500) * 35191 * 0,001$ [g/ml]

4.8. Analýza Phage display

Pufry: TBS pufr, TBST¹ pufr (0,1% Tween 20), TBST² pufr (0,5 % Tween 20) PEG/NaCl, Alkalické Tris, Eluční pufr, Blokovací pufr P.d., LB1 pufr, inhibitory proteáz MixB (viz materiál 3.4.1); Jodidový pufr, TE pufr (viz materiál 3.3.1)

Materiál pro kultivaci: LB, LB/IPTG/Xgal plotny, TOP Agaróza, zásobní roztok

IPTG/xgal, Tetracyklin ([viz materiál 3.2.1](#))

Pozn.: Experiment byl prováděn pomocí knihovny Ph.D.-12TM Phage display Kit (New England Biolabs). Celkem 4 kola selekce („panning“). V každém kole selekce jsme používali vypurifikované GST-fúzní SH3 domény p130Cas vyizolované ze 40 ml bakteriální kultury ([viz 4.6.](#)). Schéma analýzy Phage display [viz Obr. 4.1](#)

Selekce vazebné sekvence

- Zaočkujeme 10 ml LB media (volitelně s tetracyklinem = Tet) bakteriální kulturou K12 (= ER2738) inkubujeme při 37 °C přes noc, alternativně zaočkujeme bakterie K12 ráno v den pokusu do 10 ml LB+(Tet) media pro *stanovení titru fágů** (třepání 4-8 hodin na OD₆₀₀ ~ 0,5) a do 20 ml LB+(Tet) media pro *amplifikaci fágů* (růst 1-2 hodiny, pak ředit na OD₆₀₀ 0,01 – 0,05).
- K proteinové glycerolové konzervě (na ledu rozmrzlé či čerstvě připravené) obsahující fúzní protein GST-SH3 p130Cas ([viz 4.6](#)) přidáme 500 ul LB1 pufru s inhibitory proteáz pro odmytí od glycerolu.
- Sefarózu usadíme centrifugací (Eppendorf Centrifuge 5417R, 1000 - 1500 g, 2 min, 4 °C) a znova promyjeme pufrem LB1.
- K sedimentované sefaróze přidáme 1 ml blokovacího pufru P.d. a inkubujeme 1 hodinu na rotátoru při 4°C (mírné otáčky).
- Centrifugujeme 2 min, 1000 - 1500 g při 4 °C (Jouan MR22i, úhlový rotor) a odstraníme blokovací pufr.
- 6 x opláchneme 1 ml TBST¹ (Jouan MR22i, úhlový rotor; 2 min, 1000 - 1500 g, 4°C)
- Ke GST-SH3 sefaróze přidáme 1 ml TBS a 4·10¹⁰ fágových partikulí (cca 10 ul fágové knihovny)
- Inkubujeme na rotátoru 60 min při 4 °C
- Centrifugujeme 2 min, 1000 - 1500 g při 4 °C (Jouan MR22i, úhlový rotor) a odstraníme TBS
- 10 x promyjeme 1 ml TBST¹ (Jouan MR22i, úhlový rotor; 2 min, 1000 - 1500 g, 4 °C)
- Navázané fágy eluujeme 100 ul elučního pufru 15 min při laboratorní teplotě za mírného třepání

- Centrifugujeme 2 min, 1000 - 1500 g při 4 °C (Jouan MR22i, úhlový rotor) a odebereme supernatant do nové zkumavky
- K eluátu ihned přidáme 15 ul Tris-HCl (pH 9,1) pro neutralizaci pH
- Pro stanovení titru odebereme z eluátu 1 ul a uděláme ředící řadu (10^3 - 10^5) pro stanovení titru*. Zbytek eluátu (ten samý den) amplifikujeme+

+*Amplifikace fágů* (pro další kola selekce či pro Analýzu rel. afinit)

- Přes noc narostlou bakteriální kulturu K12 naředíme 1:100 LB médiem (+ Tet) do 20 ml nebo použijeme 20 ml bakteriální kultury narostlé v den pokusu (OD_{600} 0,01 - 0,05).
- K této kultuře přidáme fágový eluát a inkubujeme 4,5 hod při 37 °C za výrazného třepání
- Po této době kulturu převedeme do centrifugačních zkumavek a stočíme (Jouan MR22i, výkyvný rotor; 10 min, 4000g, 4 °C)
- Supernatant převedeme do nových zkumavek a přidáme 1/6 objemu PEG/NaCl a necháme precipitovat přes noc při 4°C (nejméně 2 hodiny).
- Precipitát centrifugujeme (Jouan MR22i, výkyvný rotor; 20 min, 4000g, 4 °C)
- Odstraníme supernatant a pelet resuspendujeme v 1 ml TBS.
- Stočíme v centrifuze (Jouan MR22i, úhlový rotor; 5 min, 10000g, 4°C) pro odstranění zbytkových bakterií
- Supernatant převedeme do nových zkumavek a opět pře-srážíme pomocí 1/6 objemu PEG/NaCl na ledu 60 min.
- Pelet resuspendujeme ve 200 ul TBS (pro další kolo selekce) či v 50 ul TBS (pro Analýzu rel. afinit). Toto je amplifikát.
- Odebereme 1-10 ul amplifikátu a uděláme ředící řadu (10^9 - 10^{13}) pro stanovení titru*. Zbytek lze skladovat pár týdnů ve 4 °C bez výrazné ztráty titru, pro dlouhodobé uchování přidáme 200 ul 60% glycerolu a skladujeme v -20 °C.

Výše uvedené kroky představují jedno kolo selekce fágových partikulí nesoucích selektovanou sekvenci. Tyto kroky opakujeme celkově čtyřikrát pro nalezení dostatečně „zakonzervované“ sekvence. Po prvním kole selekce používáme místo pufru TBST¹ pufr TBST², což zvyšuje preferenci sekvence s vyšší afinitou, a přidáváme ke GST-SH3 sefaroze $2 \cdot 10^{11}$ fágů (vypočteno na základě stanovení titru*).

** Stanovení titru fágů*

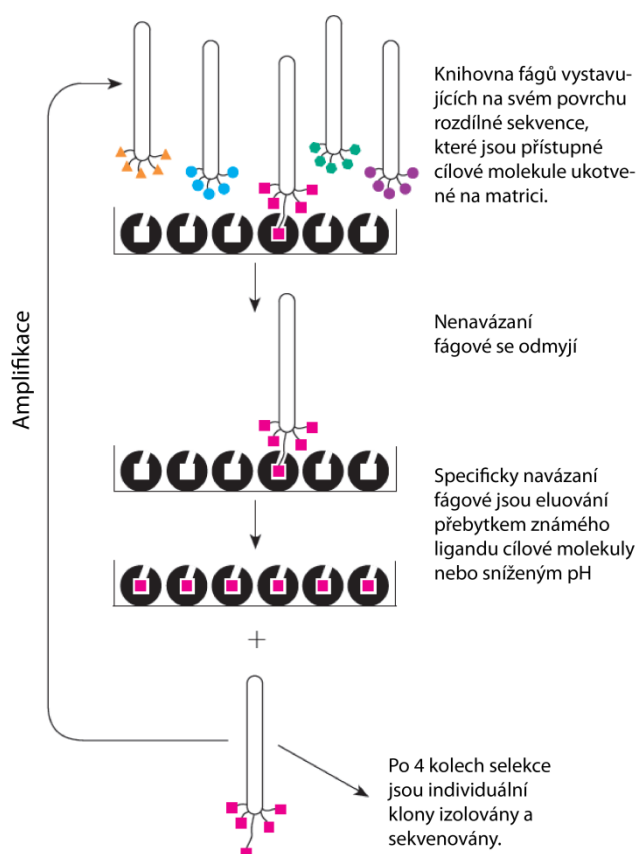
- Přes noc narostlou bakteriální kulturu K12 naředíme 1:100 LB médiem (+ Tet) na 20 ml nebo použijeme 10 ml bakteriální kultury narostlé v den pokusu (třepání 4-8 hodin na $OD_{600} \sim 0,5$).
- Vytemperujeme LB/IPTG/Xgal plotny na 37 °C a rozežhátou „Agarose top“ si rozpipetujeme po 3 ml (na 1 amplifikát) do sterilních 15 ml falkon. Tyto falkony udržujeme na 45 °C pomocí vodní lázně.
- Uděláme ředící řadu fágů pomocí LB média v mikrozkušavkách v rozmezí 10^9 - 10^{13} pro amplifikované fágy, 10^1 - 10^4 pro neamplifikované fágy (měníme špičky!).
- Z každé ředící řady, odebereme vždy 10 ul a přidáme ke 200 ul kultury K12 (přes noc narostlá 1:100 ředěná, anebo zaočkovaná ve stejný den ráno - $OD_{600} \sim 0,5$).
- Zkušavky s K12 kulturou a fágy necháme 1-5 minut stát (infekce)
- poté K12 kulturu s fágy převedeme do předem rozežhátého „Agarose top“ (na vodní lázni 42 °C), zvortexujeme a IHNED přelijeme na předem vytemperované LB/ IPTG/ Xgal plotny. Necháme ztuhnout a poté omotáme petriho misky parafilmem zabráňujícím vysychání plotny.
- Inkubujeme v termoboxu přes noc při 37°C.
- Druhý den stanovíme titr přepočítáním barevných plaků (modrých).

Charakterizace vazebné sekvence

Po posledním kole selekce můžeme přistoupit k sekvenaci DNA z vypíchnutých fágů (Inkubace fágů na LB/IPTG/Xgal plotnách maximálně 24 hodin)

- Kulturu K12 narostlou přes noc ředíme 1:100 do 1 ml LB (+ Tet) media (nebo použijeme 1 ml bakteriální kultury narostlé v den pokusu (OD_{600} 0,01 – 0,05)).
- Pomocí sterilního párátko vypíchne barevný plak a převedeme do zkušavky s LB (+ Tet) médiem.
- Necháme 4,5 hod inkubovat při 37 °C za výrazného třepání.
- Po uplynutí této doby sedimentujeme bakterie centrifugací (Jouan MR22i, úhlový rotor; 5 min, 10000g, 4 °C)
- Odebereme supernatant a opět centrifugujeme pro odstranění zbytkových bakterií (Jouan MR22i, úhlový rotor; 5 min, 10000g, 4 °C)

- 500 ul supernatantu převedeme do nových zkumavek a přidáme 200 ul PEG/NaCl
- Necháme stát při laboratorní teplotě 10-20 min.
- Centrifugujeme (Jouan MR22i, úhlový rotor; 10 min, 10000g, 4 °C) a odstraníme supernatant. Poté ještě jednou krátce vzorek stočíme a opatrně odpipetujeme zbývajícím supernatant (*pelet nebude vidět*).
- Pelet pořádně resuspendujeme pomocí pipety ve 100 ul Jodidového pufru.
- přidáme 250 ul 100 % etanolu a inkubujeme 10 min při laboratorní teplotě (*jednořetězcová DNA precipituje*)
- Centrifugujeme (Jouan MR22i, úhlový rotor; 10 min, 10000g, 4 °C) a pelet opláchneme 0,5 ml 70 % etanolu.
- Necháme vyschnout (respektive vysušíme ve vakuové odparce) a pelet rozpustíme v 30 ul TE pufru (materiál vhodný pro *sekvenaci*, lze použít i dH₂O). Fágová DNA může být i dle potřeby v TE pufru dlouhodobě skladována při -20 °C.



Obr. 4.1 Přehled metody Phage Display. Obrázek převzat a upraven od firmy New England Biolabs.

4.9. Analýza relativních afinit

Roztoky: pufr TBS, TBST (0,5% Tween 20), Blokovací pufr _{ELISA}, substrát ABTS ([viz materiál 3.4.1](#)); anti-M13 protilátka konjugovaná s HRP ([viz materiál 3.4.3](#)).

Pro tuto analýzu si předem připravíme amplifikované fágy se zjištěnou koncentrací (skladovat při 4 °C maximálně 14 dní, [viz amplifikace u metody 4.8](#)) a vypurifikované SH3 domény uvolněné od sefarozy (skladovat při 4 °C maximálně týden, [viz purifikace přes kolonku 4.6](#)).

- Napipetujeme do jedné řady (pro každý klon fága) 96-jamkové destičky Corning po 100 µl purifikovaných SH3 domén (ředěných v TBS pH 7,4 na výslednou koncentraci dle potřeby a množství domén cca 20-100 µg/ml – *čím méně domén použito, tím potřeba více fágů*). Inkubujeme přes noc ve vlhké komůrce při 4 °C.
- Vylejeme (švihem) nenavázané SH3 domény a destičku poté přitiskneme jamkami k čistému filtračnímu papíru. Jamky třikrát promyjeme 250 µl **TBS** (pokaždé destičku přitiskneme jamkami k čistému filtračnímu papíru).
- K imobilizovaným SH3 doménám přidáme 275 µl blokovacího pufru _{ELISA} (TBS + 5 mg/ml BSA). Blokujeme i řady bez SH3 domén pro zjištění nespecifity vazby. Navíc si přibereme ještě jednu novou 96 jamkovou destičku (*stačí kultivační bez hydrofobního povrchu důležitého pro imobilizaci*) pro následnou ředící řadu fágů a přidáme do ní také 275 µl blokovacího pufru _{ELISA}. Inkubujeme destičky 1-2 hodiny při 4 °C.
- Vylejeme (švihem) přebytečný blokovací pufr z obou destiček a destičky promyjeme 6x TBST (200-275 µl na jamku, pokaždé destičku přitiskneme jamkami k čistému filtračnímu papíru).
- V destičce bez imobilizovaných SH3 domén provedeme trojkovou ředící řadu fágů ve 210 µl TBST (70 µl do 140 µl). Počáteční množství fágů závisí na afinitě fágů k SH3 doméně p130Cas či Src a na typu a množství imobilizované SH3 domény (Src SH3, p130Cas SH3; WT, YE, YF). Vstupní množství se pohybuje mezi $1 \cdot 10^{14}$ – $2 \cdot 10^{12}$ fágů pro 50 µg/ml SH3 domény p130Cas (u SH3 Src je o řád nižší), což vede k množství $5,65 \cdot 10^8$ – $1,1 \cdot 10^7$ ve 12. jamce.
- Pomocí multikanálové pipety přeneseme 100 µl fágů na jamku z každé ředící řady fágů do řady jamek s imobilizovanými SH3 doménami. Zároveň jednu (alespoň) ředící řadu fágů přeneseme také do řady bez imobilizovaných SH3 domén (ale

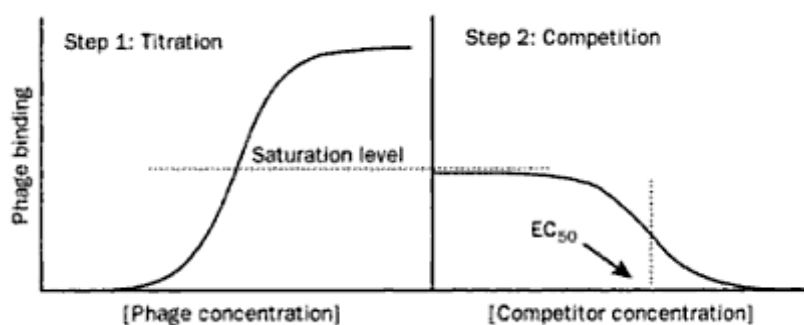
zablokované). Inkubujeme 1-2 hodiny při pokojové teplotě a třepání (300 rpm).

- Znovu promyjeme 6x TBST (jako viz výše).
- Zředíme protilátku anti-M13 konjugovanou s HRP blokovacím pufr _{ELISA} v poměru 1:5000. Přidáme 100 µl ředěné protilátky do každé jamky a inkubujeme při pokojové teplotě a třepání (300 rpm) 1 hodinu.
- Znovu promyjeme 6x TBST (jako viz výše).
- Do každé jamky přidáme najednou (co možná nejrychleji) 100 µl substrátu ABTS, inkubujeme při pokojové teplotě 5-30 min.
- Změříme absorbanci vzorků pomocí spektrofotometru Varioskan Flash (Thermo scientific) při 415 nm. Relativní afinity spočítáme z grafu (při logaritmickém vynesení na ose x) na základě množství fágů vedoucí k poloviční saturaci SH3 domén (poloviční výstupní signál)

4.10. Stanovení hodnoty EC50

Roztoky: pufr TBS, TBST (0,5% Tween 20), Blokovací pufr _{ELISA}, substrát ABTS ([viz materiál 3.4.1](#)); anti-M13 protilátka konjugovaná s HRP ([viz materiál 3.4.3](#)).

Stanovení hodnoty EC50 předchází zjištění minimální koncentrace imobilizovaných domén dostačující pro získání dobrého výstupního signálu pomocí ředící řady imobilizovaných domén (ke všem řadám přidána shodná ředící řada fága; [viz metoda 4.9](#); u SH3 domény p130Cas jsme pracovali s 20 µg/ml) a následné určení přesného množství fágů vedoucí k 50% saturaci domén ([viz graf 4.2](#); vhodné více opakování, upřesnění hodnoty v den pokusu EC50). V den experimentu budeme potřebovat amplifikované fágy se zjištěnou koncentrací ([viz amplifikace u metody 4.8](#)) a velké množství purifikovaných SH3 domén uvolněných od sefarázy ([viz metoda 4.6B](#)).



Graf 4.2 Schematický postup pro získání EC50. Obrázek převzat z (Patil, 1996).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	PK	NK
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----

Obr. 4.2 Předpokládaný výstupní signál pro stanovení hodnoty EC₅₀ po přidání substrátu ABTS. PK = pozitivní kontrola, NK = negativní kontrola. 1-10 číslo jamky (v jamce 1 je největší koncentrace kompetičních domén vedoucí k vyvážení největšího množství fágů, a tedy nejmenšímu signálu)

- Napipetujeme do jedné řady jamek 1-11 (pro jeden klon fága) 96-jamkové destičky Corning po 100 μ l purifikovaných SH3 domén (ředěných v TBS pH 7,4 na výslednou koncentraci 20 μ g/ml GST fúzní SH3 domény p130Cas). Do jamky 12 v téže řadě napipetujeme 100 μ l GST o stejné koncentraci jako GST-SH3 domény. Inkubujeme přes noc ve vlhké komůrce při 4 °C.
- Vylejeme (švihem) nenavázané SH3 domény a destičku poté přitiskneme jamkami k čistému filtračnímu papíru. Jamky třikrát promyjeme 250 μ l **TBS** (pokaždé destičku přitiskneme jamkami k čistému filtračnímu papíru).
- K imobilizovaným GST fúzním SH3 doménám či samotnému GST přidáme 275 μ l blokovacího pufru _{ELISA} (TBS + 5 mg/ml BSA).
- Vylejeme (švihem) přebytečný blokovací pufr z obou destiček a destičky promyjeme 6x TBST (200-275 μ l na jamku, pokaždé destičku přitiskneme jamkami k čistému filtračnímu papíru).
- Podle koncentrace purifikovaných domén (GST fúzních SH3 p130Cas – použijeme jako kompetiční domény) provedeme v deseti mikrozku mávkách či 15 ml falkonách dvojkovou a trojkovou ředící řadu kompetičních domén (80 μ l na jamku) v TBST (začínaje cca 800 μ g/ml – konče 1 μ g/ml). Přidáme 80 μ l kompetičních domén na jamku k imobilizovaným doménám do jamek 1-10 (do jamky jedna nejvyšší koncentraci, do jamky deset nejnižší). Do jamek 11 a 12 přidáme 80 μ l samotného TBST pufru.
- Přidáme do všech jamek 20 μ l fágů obsahující požadované **množství** pro 50 % saturaci (čili 20 μ l fágů v **koncentraci** 5x vyšší) GST fúzních SH3 domén p130Cas (imobilizované v koncentraci 20 μ g/ml) a inkubujeme při pokojové teplotě a za třepání (více než 300 rpm) 1 hodinu.
- Znovu promyjeme 6x TBST (jako viz výše).
- Zředíme protilátku anti-M13 konjugovanou s HRP blokovacím pufr _{ELISA} v poměru 1:5000. Přidáme 100 μ l ředěné protilátky do každé jamky a inkubujeme při pokojové teplotě a třepání (300 rpm) 1 hodinu.
- Znovu promyjeme 6x TBST (jako viz výše).

- Do každé jamky přidáme najednou (co možná nejrychleji) 100 µl substrátu ABTS, inkubujeme při pokojové teplotě 5-30 min.
- Změříme absorbanci vzorků pomocí spektrofotometru Varioskan Flash (Thermo scientific) při 415 nm.
- Hodnotu EC50 vyhodnotíme z dat (po přepočtení hmotnostní koncentraci na molární – lze použít program http://molbiol.ru/eng/scripts/01_04.html) pomocí programu Sigmaplot s přednastaveným algoritmem „Standard Curves Analysis“.

4.11. Vazebné analýzy

4.11.1. GST-SH3 „Pull down“

Roztoky: LB1 pufr, inhibitory proteáz MixB, Glutathione SepharoseTM 4B ([viz materiál 3.4.1](#)), DTT, pufr Laemmli ([viz materiál 3.4.3](#))

- K proteinovým glycerolovým konzervám (na ledu rozmrzlým) obsahujícím fúzní protein různých variant GST-SH3 ([viz 4.6](#)) přidáme 500 ul LB1 pufru s inhibitory proteáz pro odmytí glycerolu
- Sefarózu usadíme centrifugací (Eppendorf Centrifuge 5417R, 1000 - 1500 g, 2 min, 0 °C)
- Sedimentovanou sefarózu opatrně resuspendujeme v 60 ul LB1 pufru s inhibitory proteáz (celkový objem 120 ul)
- Pro pull-down odebereme 20 ul 50 % agarózové suspenze
- Pro snazší manipulaci se sefarózou přidáme tzv. „nosičovou“ (prázdnou) sefarózu (promytou od etanolu pomocí pufru LB1) na výsledný objem 40 ul 50 % sefarózové suspenze (*stále pracujeme na ledu*)
- K výsledné suspenzi sefarózy přidáme 1 ml supernatantu lyzátu z buněk MDA-231MB vytvořeného pufrům Nonidet ([viz 4.5](#)). *Pozn.:* Jako pozitivní kontrolu pro SDS-PAGE odebereme 20 ul MDA-231MB (tzv. totální lyzát)
- Inkubujeme 2 hod při 4°C na rotátoru při mírných otáčkách
- Vzorky promyjeme 3 x LB1 pufrům s přidávanými inhibitory proteáz (Eppendorf Centrifuge 5417R, 1000 - 1500 g, 2 min, 0 °C)
- Po promytí odsajeme pomocí tenké jehly zbylý LB1 pufr a ihned (na ledu) přidáme 20 ul 2x Laemmli s DTT (1:20)
- Povaříme spolu se vzorkem totálního lyzátu na bločku 5 min při 95 °C a 5 min při

100 °C.

- Následuje SDS-PAGE separace navázaných proteinů (viz 4.12). Poté Western blot (viz 4.13) a imunodetekce (viz 4.13.2).

4.11.2. Imunoprecipitace – endogenní, exogenní

Materiál: HEPES pufr, protein A Sefaróza (viz materiál 3.4.1); DTT, pufr Laemmli, protilátky anti-PKN3 a anti-GFP (viz materiál 3.4.3), inhibitory proteáz MixM (viz materiál 4.5)

Imunoprecipitaci provádíme buď z lyzátů transfekovaných plazmidy kódujícími varianty proteinu p130Cas fúzovaného s GFP (WT, Y12E, Y12F, samotné GFP; precipituje exogenní p130Cas a jeho interakční partnery), anebo z netransfekovaných lyzátů (precipituje pouze endogenní proteiny). Lyzáty v obou případech vytvořeny pufrém Nonidet (viz 4.5).

- Do 1 ml lyzátu (z netransfekovaných MDA-231MB buněk) či do 500 µl lyzátu (z MDA-231MB transfekovaných plazmidem p130Cas-GFP) přidáme 1-2 µg primární protilátky (10 µl anti-PKN3, 10 µl anti-GFP). Promícháme pipetou a inkubujeme 3-4 hodiny na ledu či přes noc na ledu v lednici. *Pozn.:* Jako pozitivní kontrolu pro SDS-PAGE odebereme 20 µl MDA-231MB (tzv. totální lyzát)
- V mezikasu 4x promyjeme Protein A sefarózu (20-30 µl 50 % sefarózy na vzorek) pufrém HEPES od etanolu (Eppendorf Centrifuge 5417R, 1000 - 1500 g, 2 min, 0°C). Poté opět vytvoříme 50% roztok sefarózy přidáním příslušného objemu pufru HEPES s inhibitory proteáz (asi 15 µl)
- Do lyzátu přidáme 20-30 µl promyté 50 % protein A sefarózy a inkubujeme 1-2 hodiny při 4°C na rotátoru při mírných otáčkách.
- Vzorky 3x promyjeme 1 ml pufru Nonidet (s přidáním inhibitory proteáz), 1 x v HEPESU (*na ledu, používáme tenkou jehlu pro odsání celého objemu roztoku bez kuliček*)
- Odsajeme do sucha tenkou jehlou a přidáme 20-30 µl vzorkového pufru 2x Laemmli s DTT (1:20). Povaříme spolu se vzorkem totálního lyzátu na bločku 5 min při 95 °C a 5 min při 100 °C.
- Následuje SDS-PAGE separace navázaných proteinů (viz 4.12). Poté Western blot (viz 4.13) a imunodetekce (viz 4.13.2).

4.12. Tris – glycinová SDS gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Roztoky: Protogel, 4xTris/SDS pH 6,8 a 8,8; Laemmli pufr; DTT; TEMED; APS; SDS-PAGE pufr, miliporová voda ([viz materiál 3.4.3](#))

Pro nalití gelu použijeme soupravu BIO-Rad mini Protean III Cell. Po sestavení této aparatury (viz manuál výrobce) namícháme směs pro separační gel a ihned aplikujeme do prostoru mezi skla v aparatuře a překryjeme vrstvou miliporové vody. Po ztuhnutí gelu (cca 10-30 min) vodu odsajeme a nahradíme čerstvě namíchanou směsí pro zaostřovací gel. Mezi skla vložíme hřeben na vytvoření jamek pro nanášení vzorků. Po polymeraci zaostřovacího gelu (cca 30 min) jamky několikrát propláchneme pufr pro SDS-PAGE. Dvojici gelů (nebo jeden gel a doplňující nástavec) vložíme do aparatury pro elektroforézu a zalijeme pufr pro SDS -PAGE.

Roztoky proteinů ve vzorkovém pufru doplníme 1/20 objemu 1 M dithiothreitolu (DTT), inkubujeme 5 minut při 100°C a po odstranění případných pevných součástí centrifugací (10 000 g, 0,5min) nanese do jamek v gelu.

Dokud se bromfenolová modř ze vzorkového pufru (a spolu s ní tzv. čelo elektroforézy) pohybuje v zaostřovacím gelu, probíhá elektroforetické dělení při konstantním proudu 10 mA/gel. Později nastavíme protékající proud na 20 mA/gel. Když čelo elektroforézy dosáhne spodního okraje gelu, odpojíme zdroj elektrického napětí a gel vyjmeme z aparatury. Gel lze barvit nebo použít pro přenos proteinů na membránu metodou western blot.

Směs pro 2 gely silné 0,75 mm smícháme v následujícím pořadí:		
	10 % separační gel	Zaostřovací gel
Protogel	3,33 ml	0,65 ml
pufr	2,5 ml 4x Tris/SDS pH 8,8	1,25 ml 4x Tris/SDS pH 6,8
voda	4,17 ml	3,1 ml
TEMED	12 µl	10 µl
10 % APS (NH ₄ S ₂ O ₈)	60 µl	50 µl

4.12.1. Barvení PAA gelu pomocí barviva Coomasie Blue

Roztoky: Barvicí a odbarvovací roztok ([viz materiál 3.4.3](#))

Na PAA gelu je po proběhlé SDS elektroforéze možné nespecificky obarvit rozdělené proteiny. Toto provedeme tak, že gel opatrně přeneseme do barvicího roztoku a necháme za mírného třepání barvit nejméně 30 min (lze do druhého dne). Po této době přebytečný barvicí roztok slijeme. Gel promýváme do odbarvení pomocí odbarvovacího roztoku.

4.13. Western blot

Roztoky: Přenosový pufr, TBS a TTBS ([viz materiál 3.4.3](#))

Přenos proteinů na membránu použijeme aparaturu BIO-RAD Trans-blot. Gel s proteiny rozdělenými SDS-PAGE přeneseme na filtrační papír Whatman navlhčený v blotovacím pufru a sestavíme aparaturu pro přenos na nitrocelulózovou membránu (Nitrobind, MSI, USA) v následujícím pořadí: izolační houbička, filtrační papír Whatman, gel, membrána (omytá v blotovacím pufru), filtrační papír Whatman, izolační houbička.

Přenos necháme probíhat při napětí 100 V za stálého míchání a chlazení ledem po dobu 1,5 h (pro proteiny menší než 30 kDa pouze 45 min - 1 h). Membránu s přenesenými proteiny opláchneme v TBS a zatavíme do polyetylenové fólie pro pozdější zpracování nebo ihned provedeme imunodetekci proteinů (či nespecifické barvení pomocí Ponceau S). Gel po blotování můžeme pro kontrolu přenosu proteinů barvit cca 30 min barvicím roztokem a poté nechat odbarvovat do druhého dne.

4.13.1. Reverzibilní barvení proteinů na membráně pomocí Ponceau S

Materiál: barvicí roztok Ponceau S, miliporová voda ([viz materiál 3.4.3](#))

Po přenosu proteinu z SDS-PAGE gelu na nitrocelulózovou membránu lze tuto membránu reverzibilně obarvit pomocí barviva Ponceau. Tento postup nám umožní nespecifické obarvení proteinů těsně před imunodetekcí. Po opláchnutí membrány TBS po transferu z gelu na membránu aplikujeme barvicí roztok Ponceau S. Při mírném třepání necháme 10 min. barvit na třepačce. Odbarvujeme vychlazenou miliporovou vodou do odbarvení pozadí. Membránu umístěnou do čisté polyetylenové fólie naskenujeme. Takto obarvenou membránu podrobíme imunodetekci.

4.13.2. Imunodetekce proteinů na membráně

Materiál: Blokovací roztoky, TBS, TTBS, primární a sekundární protilátky (a roztoky pro jejich ředění), souprava SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate ([viz materiál 3.4.3](#))

Membránu s přenesenými proteiny opláchneme roztokem TBS a blokujeme 30 minut až 1 hodinu ve zvoleném blokovacím roztoku ([viz materiál 3.4.3](#)) na překlápěcí třepačce (Biosan, MR-1). Následně oplachujeme 3 x 5 min ve velkém objemu TTBS. Opláchnutou membránu zatavíme do polyetylenové fólie a inkubujeme s roztokem primární protilátky přes noc (cca 16 – 18 h) na překlápěcí třepačce v lednici při 4 °C. Nadbytečnou primární protilátku pak odstraníme odmytím v TTBS (3x 5 min).

Roztok sekundární protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou nebo křenovou peroxidázou přidáme k membráně zatavené do polyetylenové fólie, doba inkubace činí 1 h. Poté membránu odmyváme 2 x 5 min v TTBS a 1 x 5 min v TBS v dostatečném objemu roztoku.

Pozn.: Membránu blokujeme a inkubujeme s protilátkou vždy v roztoku se stejným typem „nosné látky“, tj. po blokování v 4 % BSA inkubujeme membránu s roztokem primární a sekundární protilátky ředěné v 1 % BSA.

Membránu inkubujeme ve vyvíjecím roztoku pro křenovou peroxidázu (smíchání roztoků luminolu a stabilního peroxidu v poměru 1:1) 1-2 min za stálého třepání, aby se dostatečně omyla celá plocha membrány. Membránu krátce osušíme a vložíme do průhledné polyetylenové fólie. Poté v temné komoře přiložíme na membránu film (Amersham Hyperfilm ECL, nebo použitím přístroje LAS 4000) a necháme exponovat požadovanou dobu dle množství detekovaného proteinu a kvality protilátek.

Pozn.: Membránu lze po imunodetekci opakovaně „stripovat“ pomocí stripovacího pufru ([viz materiál 3.4.3](#)) a znovu podrobit imunodetekci: Membránu promyjeme v TBS a inkubujeme ve stripovacím pufru (falkona zabalená do alobalu) 30 minut ve vodní lázni při 50 °C. Následně membránu 3x oplachujeme v TTBS (3x 5 min) a pokračujeme blokováním 30 minut až 1 hodinu ve zvoleném blokovacím roztoku (viz nahoře).

4.14. Imunohistochemické barvení savčích buněk

Roztoky: PFA, PBS, Blokovací roztok, permeabilizační roztok, DABCO, Fibronectin, Faloidín ([viz materiál 3.4.2](#))

Protilátky – primární a sekundární protilátky ([viz materiál 3.4.3](#))

- Krycí sklíčka se omývají v HCl pro zdrsnění povrchu, pak ve vodě a uchovávají se v čistém etanolu. Před použitím se sklíčka z etanolu vytáhnou a opálí. Následně sklíčka vložíme do 12-ti jamkové destičky.
- Připravíme si roztok fibronectinu 10 µg/ml ve vodě (zásobní roztok 1 mg/ml) a tímto roztokem pokryjeme sklíčka (100 µl na sklíčko). Sklíčka s fibronectinem necháme ve sterilním boxu schnout cca 2 hodiny.
- Vysejeme buňky na sklíčka na velmi nízkou konfluenci 5-15 % a necháme je alespoň 2 hodiny, aby si sedly. Poté je můžeme transfekovat plazmidy kódujícími p130Cas-GFP varianty ([viz 4.4](#)).
- Buňky necháme růst v termostatu při 37 °C 48 hodin.
- 12-ti jamkovou destičku vyndáme z termostatu, odsajeme nesterilně médium a sklíčka 2x opláchneme 1x PBS.
- Buňky fixujeme 0,5-1 ml 4 % paraformaldehydu po dobu 10-15 minut.
- Dvakrát opláchneme sklíčka v 1x PBS
- Následně na buňky aplikujeme permeabilizační roztok (0,3 % Triton-X100 v PBS) po dobu 10 minut.
- Dvakrát opláchneme sklíčka v 1x PBS
- Sklíčka přeneseme z 12-ti jamkové kultivační destičky na parafilm (buňkami navrch) a blokuje 30 minut v 200 µl blokovacího roztoku (3 % BSA v PBS) ve vlhké komůrce.
- Po zablokování položíme sklíčka buňkami dolů na 50 µl kapku premixu primární protilátky (1:100 v 3 % BSA, PBS) a inkubujeme 2-3 hodiny ve vlhké komůrce.
- Sklíčka přeneseme do nové 6-jamkové kultivační destičky (snazší práce než s 12-ti) a 3-4 x promyjeme PBS po dobu 30 minut (pokaždé 10 min.)
- Sklíčka přeneseme opět na parafilm buňkami nahoru a nakápneme na ně 100 µl premixu sekundární protilátky (1:1000 v 3 % BSA, PBS). Inkubujeme 1 hodinu ve vlhké komůrce.
- Sklíčka promyjeme 3-4 krát v 1x PBS po dobu 30 minut (pokaždé 10 min.)

- Připravíme si roztok faloidínu (1:70 v 3 % BSA, PBS) a kápneme na parafilm 70 μ l. Sklíčka přiložíme buňkami dolů na kapku a inkubujeme 15 minut ve vlhké komůrce.
- Sklíčka promyjeme 3-4 krát v 1x PBS po dobu 30 minut (pokaždé 10 min.)
- Sklíčka rychle propláchneme v destilované vodě pro odstranění přebytečné soli, postavíme sklíčko na buničinu a většinu vody odsajeme. Na podložní sklíčko nanese 9 μ l montovacího média s DABCO a přikryjeme sklíčkem s buňkami.

4.15. Modelování struktur pomocí programu PyMOL

- Při modelování proteinových struktur se vychází z volně přístupných PDB (protein data bank) dat. Ty je možné získat na webových stránkách např. RSCB: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
- Při modelování struktur obsahujících proteinovou vazbu dochází při vykreslení struktury k překryvu obou struktur a tím k znemožnění vytvoření přehlednějších obrázků. Proto je potřeba vybrat sekvenci patřící jedné struktuře a přes příkazový řádek zadat vytvoření nového objektu. Jako nápověda pro správné zadávání příkazů může sloužit http://www.PyMOLwiki.org/index.php/Main_Page. Vytvoření nových objektů pak následně umožňuje samostatnou práci s každou strukturou.
- Pomocí funkcí „show“ a „hide“ můžeme zobrazovat struktury v různých vykresleních (např. celý povrch, či stužkový model). Funkcí „select“ s následným „colour“ upravujeme zabarvení struktur, nebo jen jejich částí. Funkcí „render“ (ray) dosahujeme vykreslení obrázku do publikovatelné kvality.
- V programu PyMOL (verze 1.4.1) lze docílit vytvoření fosforylovaného stavu aminokyseliny pomocí funkce „build“. Tato funkce umožňuje přidat na OH skupinu tyrosinu atom fosforu, u něhož lze pomocí příkazového řádku změnit valenci a upravit ho na výslednou fosfátovou skupinu.
- Pomocí funkce „mutagenesis“ můžeme vybrat energeticky nejvýhodnější rotamer pro danou aminokyselinu. K tomuto jsme přistoupili pro vybrání stericky nejvýhodnějšího rotameru tyrosinu 12 SH3 domény p130Cas s navázanou fosfátovou skupinou a pro mutagenezi centrální aminokyseliny ligandu SH3 domény Crk. Program rotamery vybírá na základě pravděpodobnosti výskytu daného rotameru v krystalických

strukturách známých proteinů.

- PyMOL dále umožňuje pomocí funkci „align“ na základě sekvenční podobnosti překrytí dvou příbuzných struktur. Toho jsme využili pro srovnání SH3 struktur s navázanými různými druhy ligandů.

4.16. Statistická a bioinformatická analýza

- Statistická analýza byla provedena v programu Excel s použitím dvou-výběrového Studentova t-testu.
- Bioinformatické analýzy byly provedeny pomocí programu a databází (viz odkazy):

<http://phosphonet.ca> – Kinexus (predikce fosforylačních míst)

<http://prosite.expasy.org/scanprosite/> – ScanProsite (hledání motivů
v aminokyselinové sekvenci)

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> – BLASTP (hledání proteinů na základě
aminok. sekvence)

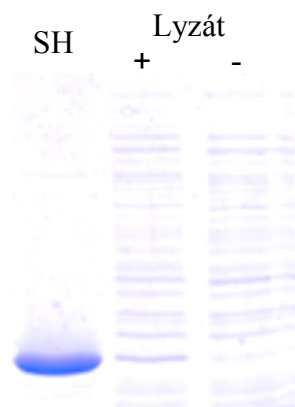
<http://npsa-pbil.ibcp.fr> – PATTINPROT (hledání proteinů na základě motivu)

<http://rosettadock.graylab.jhu.edu/> – Predikce konformace dvou interagujících
proteinů

5. Výsledky

5.1. Analýza vazebného motivu SH3 domény proteinu p130Cas

Charakterizace specifity různých SH3 vazebných domén, jako je například kinázy Src, umožnila mapování jejich interakčních sítí a poskytla informace pro popsání inhibitorů těchto interakcí. Metoda Phage display umožňuje hledání vazebného motivu a byla už v naší laboratoři zavedena (Sztacho, diplomová práce 2009). Jelikož vazebný motiv SH3 domény p130Cas dosud nebyl popsán, pouze předpovězen na základě potvrzených interakčních partnerů, rozhodli jsme se pro jeho přesnější charakterizaci, a to právě metodou Phage display. Fágová knihovna Ph.D. 12TM (New England Biolabs) obsahuje $2,7 \cdot 10^9$ různých fágů (M13) lišících se degenerovanou sekvencí 12 aminokyselin, kterou prezentují na svém povrchu a kterou mají kódovanou ve svém genomu. Z této knihovny jsme vyselektovali (celkem 4 kola selekce) klony fágů, které se vážaly s vysokou afinitou k SH3 doméně p130Cas fúzované s GST imobilizované na GSH-sefaróze (Obr. 5.1). Po 4. Kole selekce jsme náhodně vybrali na sekvenaci 20 fágových klonů, z nichž jsme získali 14 unikátních sekvencí (viz sekvenční „alignment“, Obr. 5.2).



Obr. 5.1: Purifikovaná SH3 doména p130Cas. Po indukci IPTG (+) v bakteriích dojde k masivnímu nárustu exprese různých variant SH3 domény p130Cas (Src) fúzovaných s GST a kódovaných plazmidem pGEX, který byl naší skupinou vytvořen již dříve. SH3 domény jsou pak purifikovány pomocí GSH agarózy (Glutathione SepharoseTM 4B, GE Healthcare). Takto připravené SH3 domény p130Cas (Src) byly následně použity pro Phage display, EC50 a Pull down analýzy a pro stanovení relativních afinit.

Klon	Pozice
	-3 -101234567
1	FHA--PPSKPPLPK-
18	FHA--PPSKPPLPK-
20	FHA--PPSKPPLPK-
2	GHF--APSKPPHPY-
4	NHL--APAKPSLWL-
12	AHQ--APEKPPRLRL-
9	SHN--APQKPPLFM-
3	THT--PPMKPPLSL-
5	THT--PPMKPPLSL-
7	THT--PPMKPPLSL-
8	THT--PPMKPPLSL-
11	NH--SPTKPPLPIR
19	NH--SPTKPPLPIR
17	DH--PPTKPPRSSF
6	SHSTMPPPKPRL--
10	TMT--PPPKPPLRI-
16	AHT--PPPKPTRPP-
13	WHS--APPKPPFRN--
15	WHN--PPGKPLRSG-
14	FHLE--PPDKPLRR--
	. * **

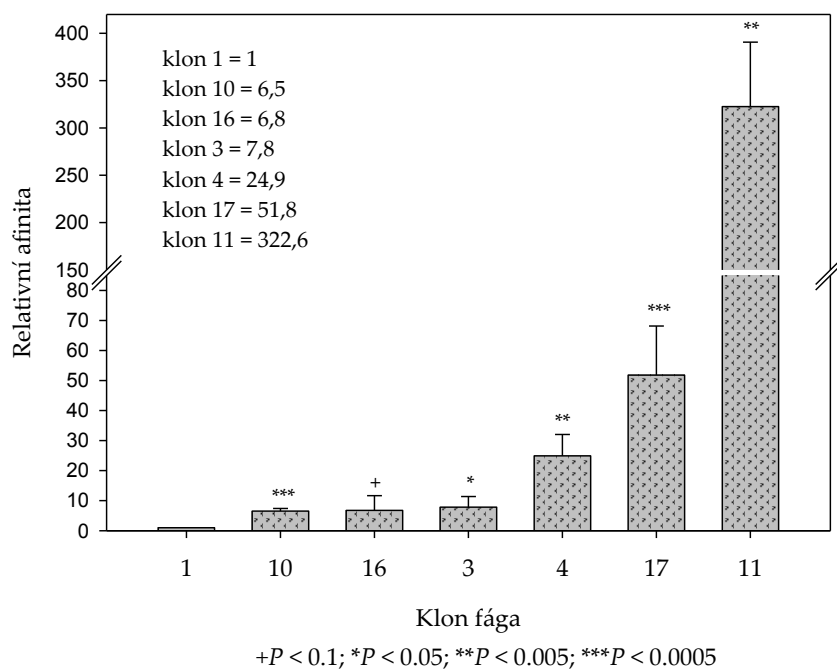
Obr. 5.2: Phage display analýza vazebného motivu rozpoznávaného SH3 doménou p130Cas. Sekvence získané po 4. kole selekce analýzy Phage display zodpovedné za vazbu SH3 domény p130Cas jsou srovnány pomocí „CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment“. Sekvence klonu 10 se nejvíce podobá sekvenci odvozené od interakčního partnera SH3 domény p130Cas proteinu PTP-PEST, klonu 16 proteinu PYK2, klon 4 proteinu C3G. Fágové se stejnou sekvencí jsou 1,18,20; 3,5,7,8 a 11,19. *Pozn.: N-konec peptidů (volný) je nalevo a C-konec napravo (fúzovaný s proteinem fága). * jsou označeny konzervované aminokyseliny.*

Porovnáním těchto sekvencí se nám podařilo vyvodit 7 aminokyselin dlouhý motiv (A/P)P₀X₁K₂P₃X₄(L/R)₅. Tento výsledek je v souladu se sekvencí většiny známých interakčních partnerů SH3 domény proteinu p130Cas (viz Tab. 2.3, str. 38) a sekvence číslo 10 se dokonce shoduje v sedmi centrálních aminokyselinách s vazebným partnerem PTP-PEST. Tímto jsme potvrdili důležitost klíčových prolinů na pozici 0 a 3 a centrálního lysinu na pozici 2. K našemu překvapení nám experiment Phage display vygeneroval kromě obvyklé kladně nabitě kotvící aminokyseliny argininu na pozici 5 také hydrofobní leucin. Tento leucin obsahovalo dokonce více než polovina získaných sekvencí. Tuto netradiční obměnu mezi SH3 doménami potvrzuje identifikovaná vazebná sekvence C3G, která je zodpovědná za vazbu k SH3 doméně p130Cas (Kirsch et al., 1998). Nicméně tento případ je ojedinělý a doposud vědeckou komunitou přehlížený. Navíc jsme pozorovali, podobně jako u analýzy Phage display s SH3 doménou kinázy Src, že N-koncová oblast získaných sekvencí je bohatá na polární aminokyseliny a téměř u všech klonů se na pozici -3 nachází histidin (respektive na pozici -6 u analýzy Phage display s SH3 Src; Sztacho, diplomová práce 2009). I proto jsme se rozhodli výše zmíněný motiv dále lépe charakterizovat. K tomuto účelu jsme si na další práci vybrali fágy (sekvence): a) všechny

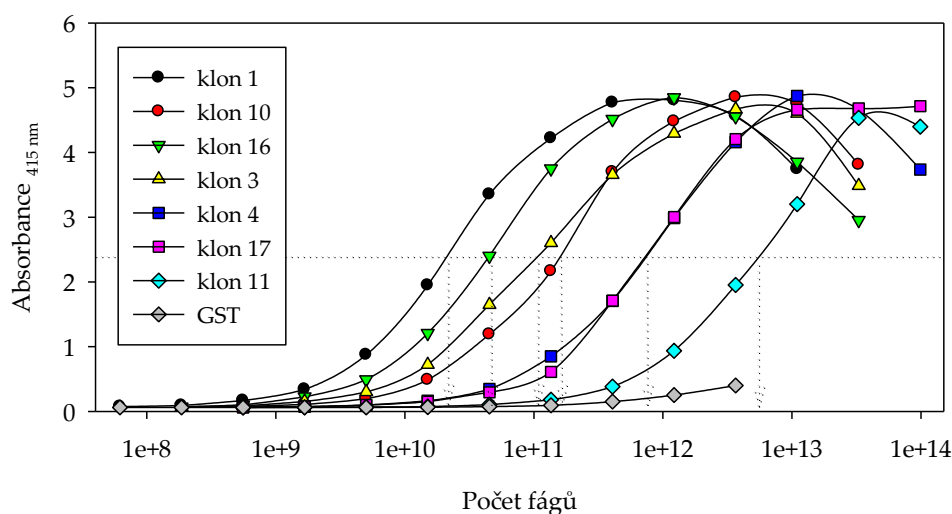
více než 1x zastoupené (*název podle prvního klonu*: 1, 3, 11) a klon 4 podobající se sekvenci odvozené od interakčního partnera SH3 domény p130Cas proteinu C3G (tyto sekvence mají kotvící leucin); b) klon 10 podobající se sekvenci odvozené od interakčního partnera SH3 domény p130Cas proteinu PTP-PEST (má kotvící arginin); c) klon 17, jehož sekvence se podobá sekvenci klonu 1 kromě kotvící aminokyseliny (arginin místo leucinu); d) klon 16, jehož sekvence se podobá sekvenci odvozené od proteinu PYK2 a jenž se liší od klonu 10 přítomností His na pozici -3. U těchto fágů jsme se pokusili stanovit relativní afinity k SH3 doméně p130Cas pomocí kvantifikace míry vazby fágových klonů k imobilizované SH3 doméně p130Cas.

Nejlépe se vázal klon 1, následován klony 10, 16 a 3 s přibližně stejnou afinitou k SH3 doméně p130Cas. Klon 4 a 17 se vázal o poznání hůře ([viz Graf 5.1](#)). Sekvence číslo 11 (S₁PTKPPLP) dle očekávání vykazovala velice nízkou afinitu (nejnižší) v porovnání s ostatními sekvencemi. Za pokles této afinity pravděpodobně může serin na pozici -1, neboť u ostatních klonů chybí. Naše data dále naznačují, že alanin na pozici -1 (A₁PxKP) by v porovnání s prolinem nemusel afinitu peptidu k SH3 doméně p130Cas snižovat (*viz diskuze*), což je v souladu s literaturou (Ohba et al., 1998). Překvapivě threonin na pozici 1 (PT₁KP) na rozdíl od serinu na stejné pozici pravděpodobně negativně ovlivňuje výslednou afinitu. Vzhledem ke komplexitě vazby SH3 domény p130Cas ke svým ligandům, kde výslednou afinitu určují aminokyseliny peptidu jako celek, nelze s určitostí vyvodit přesný příspěvek každé jednotlivé aminokyseliny na výslednou vazbu mimo esenciálního základního motivu PxKPx(L/R). Nicméně tyto experimenty naznačují, že aminokyselinová záměna kotvícího argininu za leucin výslednou sílu vazby příliš neovlivňuje nebo naopak mírně zvyšuje.

A)



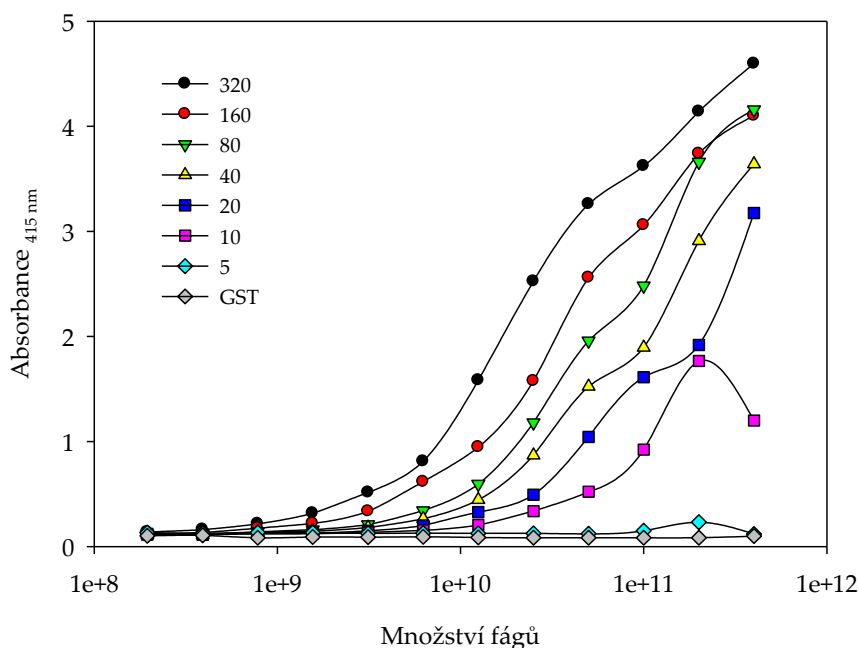
B)



Graf 5.1: Relativní afinita fágů k SH3 doméně p130Cas. SH3 doména p130Cas fúzovaná s GST (konc. 20 -100 µg/ml) byla imobilizována hydrofobní interakcí na dně jamek 96-jamkové destičky a následně titrována ředící řadou vybraných klonů fága M13. Navázané fágy jsme pak detekovali protilátkou anti-M13 konjugovanou s peroxidázou (HRP). **A)** Kvantifikace relativních afinit různých sekvencí. Relativní afinita vztažena ke klonu 1 (=1) a vypočtena na základě poměrů počtu fágů potřebných pro poloviční vyvázání imobilizovaných SH3 domén p130Cas fúzovaných s GST (viz B, tečkované čáry). Data vyhodnocena ze 4-5 úspěšných experimentů a ukázána jako průměr + směrodatná odchylka. **B)** Reprezentativní graf relativních afinit. Afinita fágů klesá zleva doprava (osa x vynesena v logaritmickém měřítku). Negativní kontrolu (viz GST) představuje samotná GST doména s fágem 1. *Grafy byly vytvořeny v programu Sigmaplot verze 11.0*

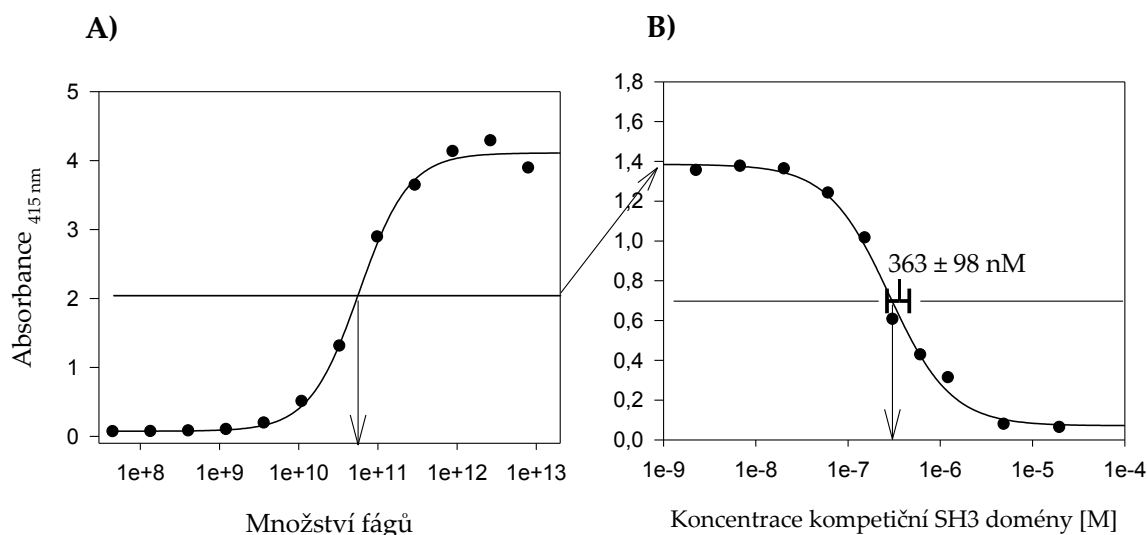
Na základě výše zmíněné analýze relativních afinit jednotlivých sekvencí a sekvencí proteinů vázajících se k SH3 doméně p130Cas s vysokou afinitou (viz Tab. 2.3, str. 38) jsme upřesnili vysokoafinitní motiv SH3 domény p130Cas na [A/P]P[A/P/M/S]KP[L/P/S/T][L/R][L/P/S/T].

Abychom byli schopni porovnat afinitu ligandů SH3 domény p130Cas s jinými SH3 doménami, rozhodli jsme se stanovit pro nejlépe se vázající sekvenci FHAPPSKPPLP hodnotu EC50 pomocí sledování míry vazby fágů na imobilizovanou GST fúzní SH3 doménu za podmínek zvyšující se koncentrace kompetitoru, tj. solubilní GST fúzní SH3 domény. Hodnota EC50 se za jistých podmínek blíže podobá hodnotě disociační konstanty, ve skutečnosti může být ale o dost nižší (Patil, 1996). Nejpresnější stanovení EC50 lze dosáhnout použitím minimální koncentrace imobilizovaného antigenu dostačujícího pro dobrý výstupní signál při použití množství fágů vedoucí k 50% saturaci domén. Náš první krok vedl tedy ke stanovení této koncentrace u GST fúzní SH3 domény p130Cas (viz Graf 5.2).



Graf 5.2: Stanovení vhodné koncentrace imobilizované SH3 domény p130Cas pro analýzu EC50. Ředící řada klonu fága 1 byla přidána k SH3 doméně p130Cas fúzované s GST, která byla imobilizována v řadách jamek 96-jamkové destičky v různé koncentraci (viz legenda, čísla jsou udávány v µg/ml; negativní kontrolu představuje imobilizované GST v konc. 50 µg/ml). Z grafu je patrné, že při nižších koncentracích SH3 domény je zapotřebí většího množství fágů pro získání signálu z plné saturace SH3 domén. *Graf vytvořen v programu Sigmaplot verze 11.0.* Reprezentativní výsledek z 3 nezávislých pokusů.

Z grafu 5.2 vyplývá koncentrace SH3 domény p130 Cas vhodná pro další práci mezi 10-20 $\mu\text{g/ml}$, nicméně nižší vedla ke zvýšené nespecifitě vazby fágů. Proto jsme zvolili koncentraci imobilizovaných GST fúzních SH3 domén 20 $\mu\text{g/ml}$. Pro tuto koncentraci jsme určili množství fágů klonu 1, vedoucí k poloviční saturaci domén, jako $5,5 \cdot 10^{10}$ (viz Graf 5.3A). Následně jsme pomocí kompetiční analýzy stanovili hodnotu EC_{50} pro sekvenci FHAPPSKPPLP klonu 1 na $363 \pm 98 \text{ nM}$ (viz Graf 5.3B). Vyšší rozptyl této hodnoty může být částečně dán odchylkami v expresi na povrchu vystavené sekvence FHAPPSKPPLP fága 1 mezi jednotlivými experimenty (podle specifikace fágové knihovny max. 5 peptidů/fág) a také chybou při počítání množství fágů.



Graf 5.3: Stanovení EC_{50} pro sekvenci FHAPPSKPPLP (klon 1). 20 $\mu\text{g/ml}$ SH3 domény p130Cas fúzané s GST bylo imobilizováno hydrofobní interakcí na dně jamek 96-jamkové destičky a **A)** titrováno ředící řadou fága 1. Navázané fágy jsme pak detekovali protilátkou anti-M13 konjugovanou s peroxidázou (HRP). Reprezentativní graf z 5 nezávislých experimentů. **B)** K imobilizovaným doménám jsme přidali ředící řadu kompetičních SH3-GST domén p130Cas v TBS s 0,5% Tween 20 a $5,5 \cdot 10^{10}$ fágů, jenž jsme odvodili z grafu 3A (viz šipka). Fágy navázané na imobilizovaných SH3-GST doménách jsme detekovali obdobně jako u předchozího experimentu. Znázorněn reprezentativní graf ze 7 nezávislých opakování experimentu s přidanou průměrnou hodnotou EC_{50} +/- směrodatná odchylka. *Grafy a křivka pro získání hodnoty EC_{50} byly zpracovány v programu Sigmaplot verze 11.0*

Hodnota EC_{50} $363 \pm 98 \text{ nM}$ představuje 3-40x silnější interakci v porovnání s afinitami většiny jiných SH3 domén k jejich vazebným sekvencím (Li, 2005; Sparks et al., 1994; Yu et al., 1994). Existují ale i SH3 domény, které vykazují dokonce vyšší sílu vazby ke svým přirozeným interakčním partnerům (Karkkainen et al., 2006). Jelikož fág 1 má oproti ostatním sekvencím mnohonásobně vyšší relativní afinitu k SH3 doméně p130Cas a jeho sekvence se liší od sekvencí známých interakčních partnerů p130Cas

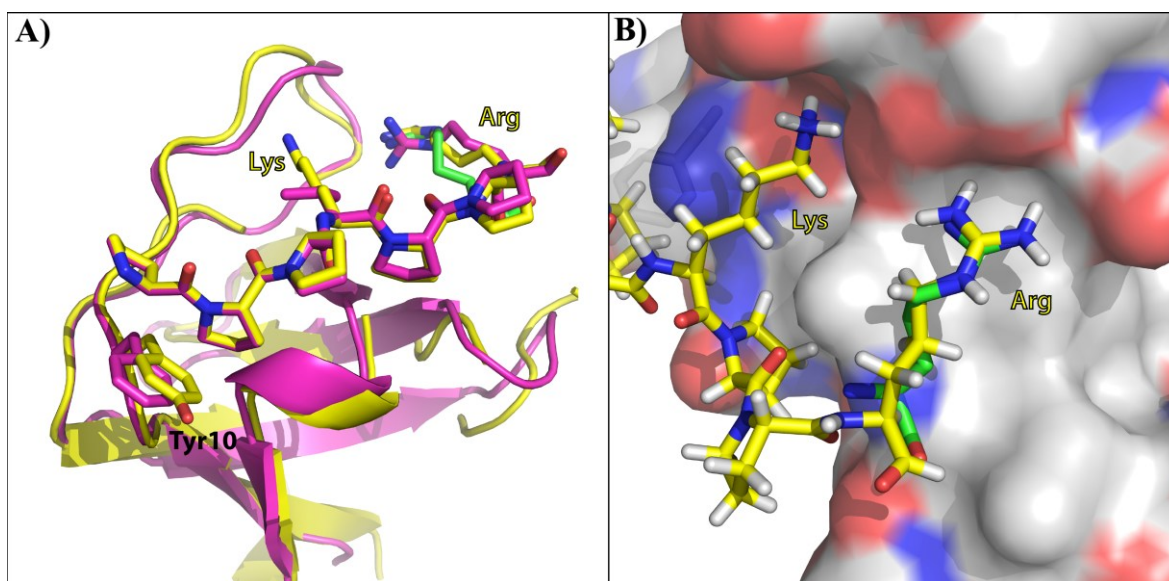
především přítomností serinu na pozici 1 a histidinu na pozici -3 (FHAPPS₁KPPLP), mohl by tento polypeptid představovat vysoce selektivní peptidový inhibitor pro tuto SH3 doménu. U ostatních fágových sekvencí jsme nebyli schopni stanovit přesnou (správnou) EC50, neboť koncentrace SH3 domén pro stanovení EC50 by u nich vzhledem k nižší afinitě byla vyšší, než jsme byli schopni připravit.

5.2. Modelování struktury SH3 domény p130Cas s peptidem PPPKPPR

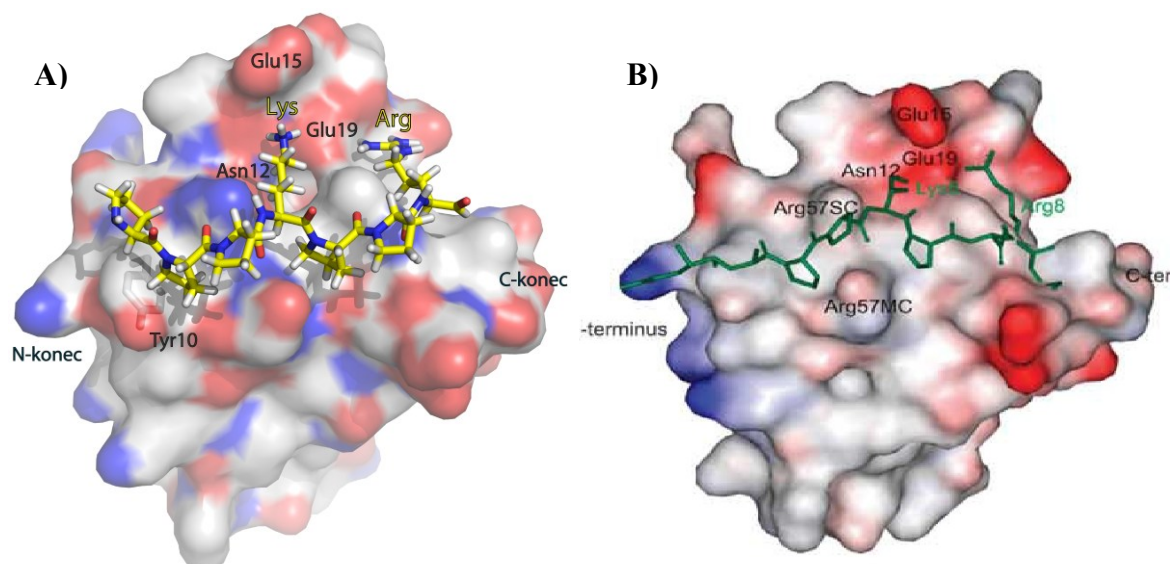
Tyrosin 10 SH3 domény p130Cas (číslování pro lidský p130Cas, Tyr12 myši) je mezi SH3 doménami značně konzervovaný a podílí se na formování vazebného místa (Wisniewska et al., 2005). V naší laboratoři bylo poukázáno, že jeho fosforylace ruší interakci SH3 domény p130Cas s jeho interakčními partnery (Janostiak et al., 2011). U analogického tyrosinu 90 SH3 domény kinázy Src byl tento negativní vliv fosforylace na vazbu ligandu II. třídy v naší laboratoři naznačen pomocí homologního modelování (Sztacho, diplomová práce 2009). Model SH3 domény p130Cas s vazebným peptidem by mohl umožnit podobné modelování a navíc by pomohl objasnit možný způsob interakce obou variant kotvicích AK, tj. hydrofobního leucinu oproti pozitivně nabitému argininu.

Pro p130Cas bohužel nebyla určena struktura jeho SH3 domény s navázaným peptidem. Strukturní srovnání mezi různými SH3 doménami v programu PyMOL ukázalo vysokou podobnost vazebného povrchu mezi SH3 doménami proteinu p130Cas a Crk ve vazebných žlábkách S1 a S2 a podobnost mezi SH3 doménami p130Cas a kinázy Src ve vazebném žlábků S3. SH3 doména Crk podobně jako SH3 doména p130Cas váže ligandy II. třídy, navíc byla dvakrát určena její struktura s peptidem odvozeným od proteinu C3G (PDB: 1CKB či 1CKA; viz Obr. 5.3A). Na základě podobnosti SH3 domény p130Cas s SH3 doménami Crk a Src jsme se pokusili vytvořit model SH3 domény p130Cas s peptidem PPKPPR, jenž odpovídá vazebnému místu na proteinu PTP-PEST. Peptid PTP-PEST jsme zvolili také proto, že je sekvenčně velmi podobný peptidu PPVPPR, se kterým byla stanovena struktura SH3 domény Crk. Peptid PPPVPPR se liší od PPPKPPR přítomností centrálního lysinu. Místo něj má hydrofobní valin, přičemž orientace zůstává zachována stejně jako je tomu u lysinu vázajícího se k SH3 doméně p130Cas. Valin na pozici dvě jsme tedy v programu PyMOL mutovali za lysin (Lys), který vybírá energeticky nejvýhodnější rotamer pro danou aminokyselinu na základě pravděpodobnosti výskytu daného rotameru v krystalických strukturách známých proteinů

(DeLano, 2002). Přítomnost Lys místo Val následně umožňuje elektrostatickou interakci mezi Lys a Glu19 (a pravděpodobně také s Asn12, Glu15) SH3 domény, a tedy stabilizaci vazby (Wisniewska et al., 2005). SH3 doména Crk je specifická ve své kapse S3, neboť obvykle váže dvě bazické aminokyseliny za sebou. Proto jsme orientaci (natočení) kotvícího arginin upravili dle orientace argininu z ligandu II. třídy SH3 domény kinázy Src (PDB: 1QWE; viz Obr. 5.3B). To umožňovalo opět iontovou interakci s Glu19 SH3 domény p130Cas. Na závěr jsme výslednou vazbu peptidu s SH3 doménou p130Cas „doladily“ pomocí programu „The Rosettadock server“ upravující protein-proteinové interakce na základě identifikace nízkoenergetických konformací (Lyskov and Gray, 2008). Výsledný model (Obr. 5.4A) se vysoce podobá modelu SH3 domény p130Cas s peptidem odvozeným od kinázy FAK vymodelovaný na základě odlišného přístupu (Wisniewska et al., 2005; Obr. 5.4B).

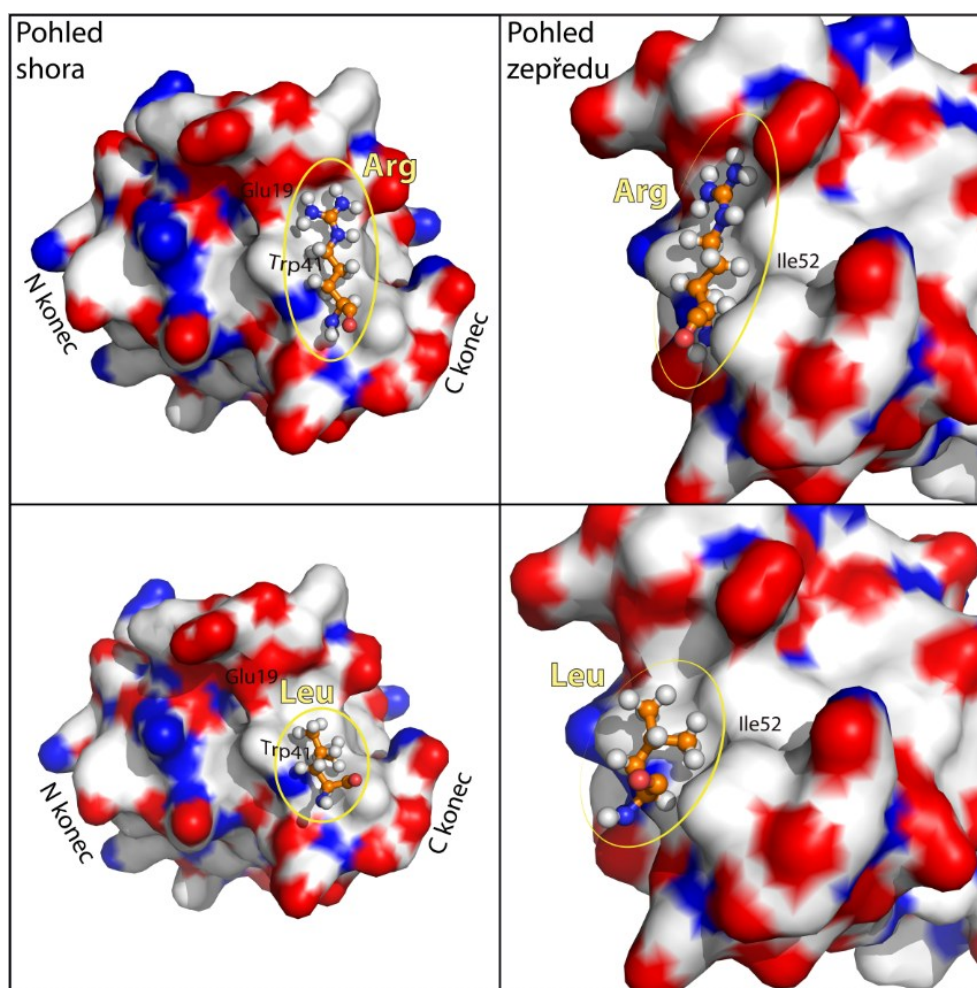


Obr. 5.3: Modelování vazby peptidu PPPKPPR na SH3 doménu p130Cas. A) Strukturní srovnání SH3 domény p130Cas (žlutě) a SH3 domény Crk a jejím peptidem PPPVPPR (růžově) B) Kotvící arginin přizpůsoben argininu z peptidu PPLPPR (zeleně) vázajícího se k SH3 doméně kinázy Src (vpravo). Použity soubory PDB: 1WYX (SH3 doména p130Cas), 1QWE (SH3 doména Src s peptidem), 1CKB (SH3 doména Crk s peptidem). Zabarvení povrchu SH3 domény podle zastoupení prvků: C, H, N, O. Zabarvení peptidu podle C (C), H, N, O. Vyobrazeno a vymodelováno pomocí programu PyMOL verze 1.4.1 (DeLano, 2002).



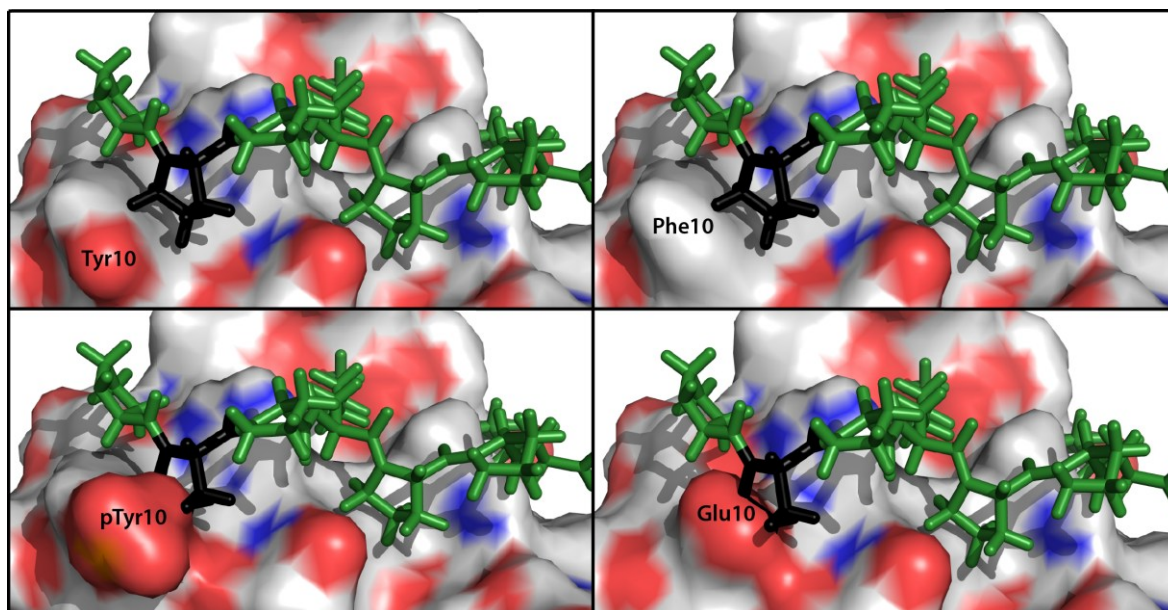
Obr. 5.4: Model SH3 domény p130Cas s peptidem PPPKPPR. **A)** Náš model s peptidem PPPKPPR (zviditelněny i vodíky peptidu). PDB (1WYX) SH3 domény p130Cas. Zabarvení povrchu SH3 domény podle zastoupení prvků: C, H, N, O. Zabarvení peptidu podle C, H, N, O. Vyobrazeno a vymodelováno pomocí programu PyMOL verze 1.4.1 (DeLano, 2002). **B)** Model skupiny Wisniewska s peptidem EAPPKPSRP odvozeným od sekvence kinázy FAK (Wisniewska et al., 2005). *Pozn.: Z obrázků je patrné, že se trochu liší v povrchu SH3 domény p130Cas, přestože se vycházelo se stejného PDB souboru. Vazebný peptid, totiž pravděpodobně částečně pozměňuje vazebný povrch domény. My jsme tento povrch ale raději neupravovali.*

Analýza Phage display ukázala, že místo kotvícího Arg může být Leu. Namodelovali jsme tedy peptid, kde byl Arg v programu PyMOL mutován za Leu. Toto modelování, podobně jako naše experimentálně ověřené vazebné analýzy, naznačilo, že Leu se váže ve třetí vazebné kapse SH3 domény p130Cas stejně dobře jako Arg. Zatímco Arg zde může tvořit solný můstek s Glu 19 a hydrofobní interakci s Trp41 (Wisniewska et al., 2005), u kotvícího Leu by se mohly uplatňovat hydrofobní interakce s Trp41 a navíc s Ile52 (Obr. 5.5).



Obr. 5.5: Navržené umístění kotvící aminokyseliny peptidu v S3 vazebné kapse SH3 domény proteinu p130Cas. Arginin pravděpodobně interaguje s Trp41 a Glu19, zatímco Leu s Ile52 a Trp41. Zabarvení povrchu SH3 domény podle zastoupení prvků: C, H, N, O. Zabarvení peptidu podle C, H, N, O. Vyobrazeno pomocí programu PyMOL verze 1.4.1 (DeLano, 2002).

Dále jsme se pokusili modelovat vliv fosforylace Tyr10 na vazbu peptidu. Po namodelování fosforylace Tyr10 (myší Tyr12) SH3 domény p130Cas došlo ke sterickému bránění s prolinem na pozici 0 peptidu PP₀PKPPR (ligand II. třídy). Přítomnost fosfátové skupiny kromě přetvoření povrchu vazebné kapsy také zásadně mění její náboj, který je nejspíš pro změnu schopnosti fosforylované SH3 domény vázat ligand klíčovější (Sztacho, diplomová práce 2009). Fosfomimikující mutace, kdy je Tyr10 zaměněn za glutamát, tento náboj do vazebného žlábků také vnáší a ačkoliv je strukturně odlišný od fosfotyrosinu, mění podobně i vazebný povrch. Substitute Tyr10 za nefosforylovatelný Phe naopak vazebný povrch výrazně nemění a výslednou sílu vazby by tedy ovlivňovat neměla ([viz Obr. 5.6](#)).



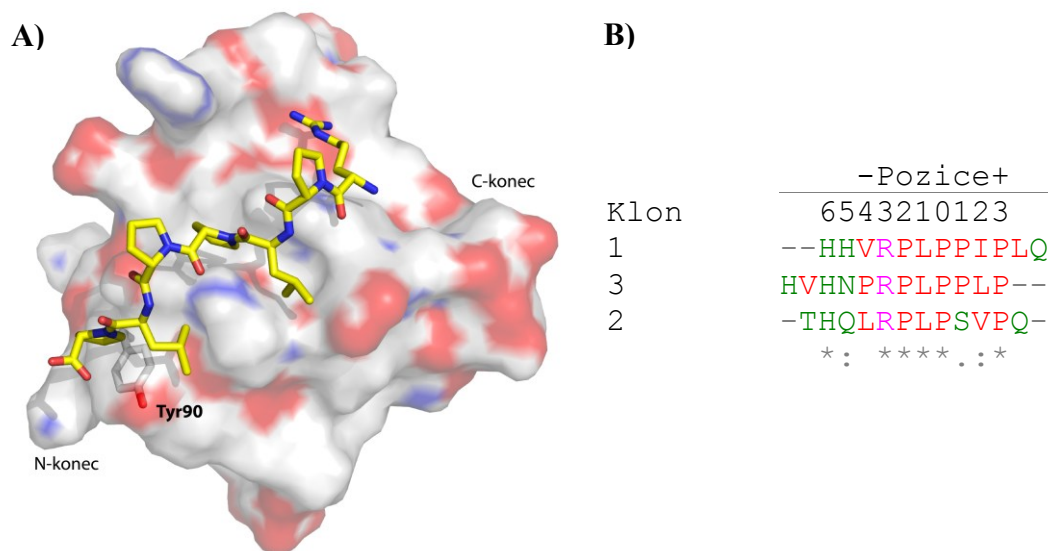
Obr. 5.6: Vliv fosforylace Tyr10 na vazbu ligandu SH3 domény p130Cas. Zabarvení povrchu SH3 domény podle zastoupení prvků: C, H, N, O. Ligand je zabarven zeleně s černě zvýrazněným prolinem na pozici 0. Vyobrazeno pomocí programu PyMOL verze 1.4.1 (DeLano, 2002).

5.3. Analýza vlivu fosfomimikující mutace tyrosinu v sekvenci ALYD SH3 domén na vazbu ligandu

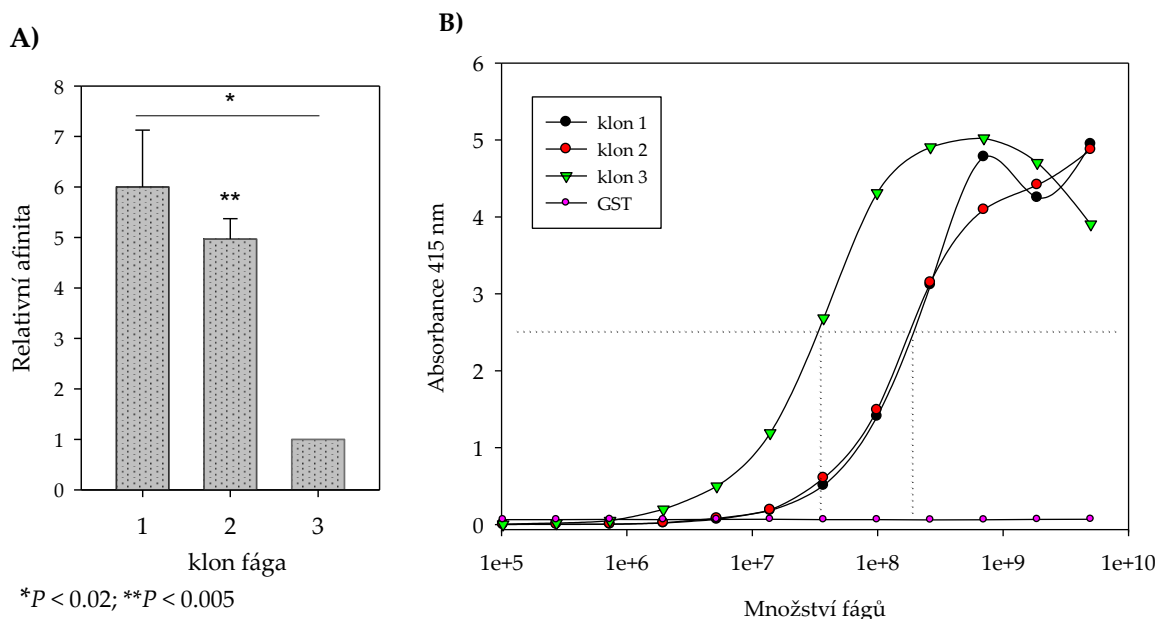
Modelování SH3 domény s mutovaným tyrosinem ze sekvence ALYD za glutamát mimikující fosfotyrosin v naší laboratoři opakovaně ukázalo, že fosforylovaný tyrosin má podobný negativní účinek jako fosfomimikující mutace na schopnost SH3 domén vázat ligandy II. třídy. To poukazuje na smysluplnost využití fosfomimikující glutamátové mutace (Janostiak et al., 2011; Sztacho, diplomová práce 2009). Tato mutace poskytuje výhodu při experimentálním ověřování vaznosti SH3 domén, neboť zaručuje při experimentálním ověřování jejich striktně „fosforylovaný“ stav bez nutnosti složité cílené fosforylace in vitro. Ačkoliv vliv tyrosinů SH3 domény ze sekvence ALYD byl v naší laboratoři již popsán, dosud nebyl pokles vazby uspokojivě charakterizován na základě experimentálních výsledků. Na Western blotech nejsme schopni detekovat vazbu interakčních partnerů k SH3 doménám p130Cas a Src nesoucím fosfomimikující mutace **Tyr10** (p130Cas, dále již jen jako myši **Tyr12**) a **Tyr90** (Src, číslování myši), což znemožňuje číselné vyjádření afinitních změn (Janoštiak, diplomová práce 2010; Sztacho, diplomová práce 2009). Analyzovali jsme tedy vliv těchto mutací na vazbu ligandů pomocí analýz relativních afinit (viz dále).

5.3.1. Tyr90 SH3 domény kinázy Src

V rámci diplomové práce Mgr. M. Sztacho provedl Phage display analýzu vazebného motivu SH3 domény kinázy Src (Sztacho, diplomová práce 2009). Využili jsme tedy výsledků této analýzy a porovnali jsme relativní afinitu tří vybraných fágových klonů (Obr. 5.7B). Nejvyšší afinitu vykazoval klon 3 (Graf 5.4), který nejlépe odpovídá známému motivu ligandu I. třídy (konsenzus RPLPPLP) pro SH3 doménu kinázy Src (Sparks et al., 1994; viz Obr. 5.7A). Pro další práci jsme tedy zvolili klon 3, u kterého jsme následně stanovili jeho relativní afinitu k variantám SH3 domén kinázy Src s mutovaným Tyr90 v motivu ALYD (WT, Y90F, Y90E; Graf 5.5).

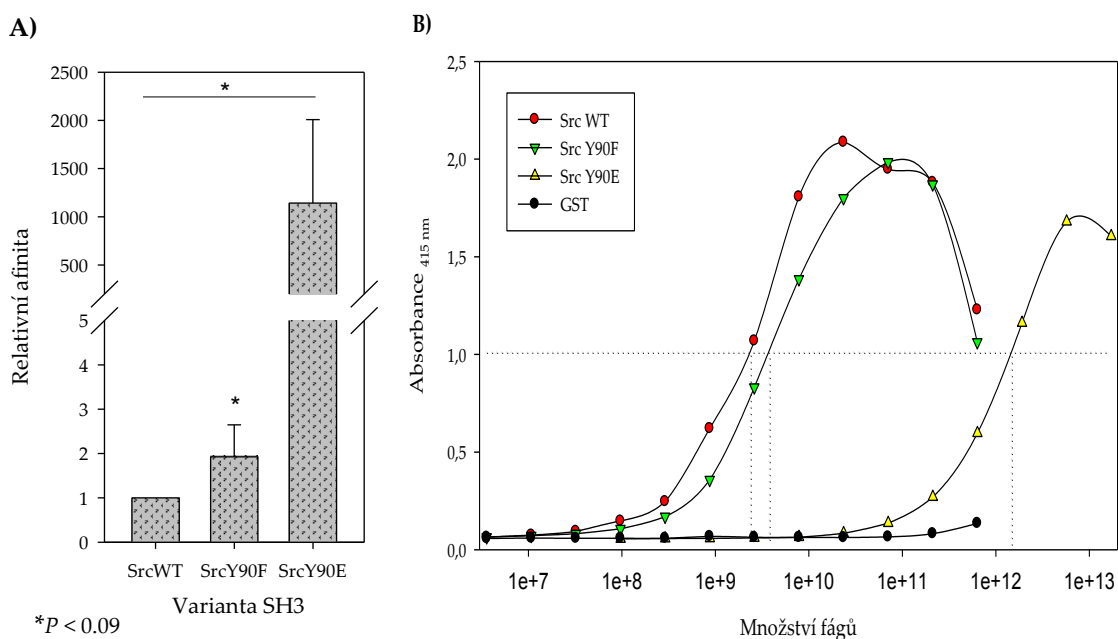


Obr. 5.7: Ligandy I. třídy a jejich vazba k SH3 doméně kinázy Src. **A)** SH3 doména kinázy Src s peptidem RPLPPLP. Soubor PDB: 1QWF. Zabarvení povrchu SH3 domény podle zastoupení prvků: C, H, N, O. Zabarvení peptidu podle C, H, N, O. Zvýrazněn Tyr90 (číslování myši) v SH3 doméně Src. Vyobrazeno pomocí programu PyMOL verze 1.4.1 (DeLano, 2002). **B)** Sekvence získané po 4. kole selekce analýzy Phage display zodpovědné za vazbu SH3 domény kinázy Src jsou srovnány pomocí „CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment“. * jsou označeny konzervované aminokyseliny.



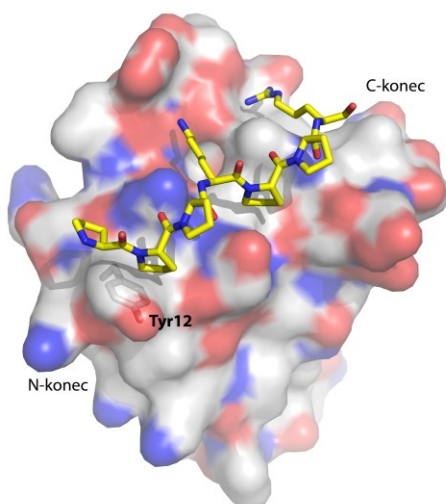
Graf 5.4: Relativní afinita vybraných klonů k SH3 doméně kinázy Src. SH3 doména Src fúzovaná s GST (konc. 100 $\mu\text{g/ml}$) byla imobilizována hydrofobní interakcí na dně jamek 96-jamkové destičky a následně titrována ředící řadou různých klonů fága M13. Navázané fágy jsme pak detekovali protilátkou anti-M13 konjugovanou s peroxidázou (HRP). **A)** Kvantifikace relativních afinit vybraných sekvencí. Relativní afinita vztažena ke klonu 3 (=1) a vypočtena na základě poměrů počtu fágů potřebných pro poloviční vyvázání imobilizovaných SH3 domén kinázy Src fúzovaných s GST (viz B, tečkované čáry). Data vyhodnocena ze 3 nezávislých opakování a ukázána jako průměr + směrodatná odchylka. **B)** Reprezentativní graf relativních afinit. Afinita fágů klesá zleva doprava (osa x vynesena v logaritmickém měřítku). Negativní kontrolu (viz GST) představuje samotná GST doména inkubovaná s fágem 3. *Grafy byly vytvořeny v programu Sigmaplot verze 11.0*

Fosfomimikující mutace Y90E v SH3 doméně Src vedla k poklesu vazby sekvence HVHNPRLPPLP více než o 3 řády v porovnání s nemutovanou (viz Graf 5.5). Fenylalaninová mutace Tyr90 snižovala afinitu pouze mírně (asi 2 krát), nicméně na western blotech jsme tento pokles vazby s interakčními partnery nepozorovali (Sztacho, diplomová práce 2009). Během imunoprecipitace („pull down“ experimentu) nejspíš dochází k částečné fosforylaci nemutované SH3 domény, což vede ke snížení množství navázaných interakčních partnerů na úroveň fenylalaninové mutanty. Tato naše analýza tedy navíc naznačuje uplatnění OH skupiny tyrosinu v interakci s polyprolinovými ligandy.



Graf 5.5: Relativní afinita sekvence HVHNPRLPPLP (klon 3) k variantám SH3 domén kinázy Src. Varianty SH3 domén kinázy Src s mutovaným Tyr90 (WT, Y90F, Y90E) fúzované s GST (konc. 50-100 $\mu\text{g/ml}$) byly imobilizovány hydrofobní interakcí na dně jamek 96-jamkové destičky a následně titrovány ředící řadou klonu fága 3. Navázané fágy jsme pak detekovali protilátkou anti-M13 konjugovanou s peroxidázou (HRP). **A)** Kvantifikace relativních afinit klonu 3 k různým variantám Src SH3 domén. Relativní afinita vztažena k vazbě klonu 3 na nemutovanou doménu WT (=1) a vypočtena na základě poměrů počtu fágů potřebných pro poloviční vyvázání imobilizovaných variant SH3 domén Src fúzovaných s GST (viz B, tečkované čáry). Data vyhodnocena ze 4 nezávislých opakování a ukázána jako průměr + směrodatná odchylka. **B)** Reprezentativní graf relativních afinit. Afinita fágů klesá zleva doprava (osa x vynesena v logaritmickém měřítku). Negativní kontrolu (viz GST) představuje samotná GST doména inkubovaná s fágem 3. *Grafy byly vytvořeny v programu Sigmaplot verze 11.0*

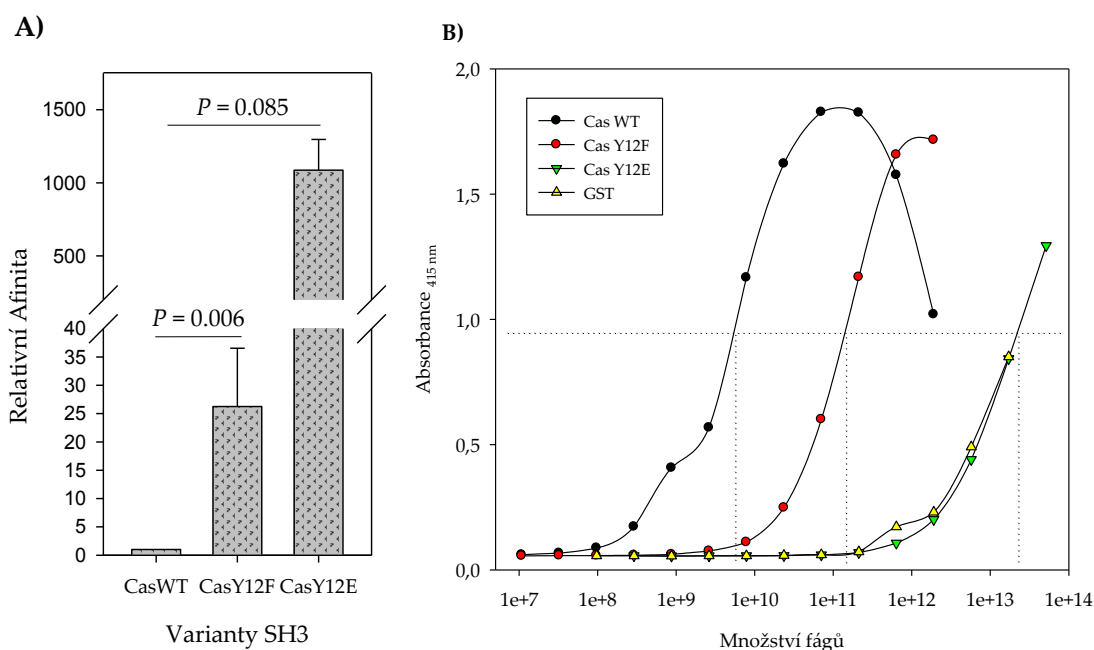
5.3.2. Tyr12 SH3 domény proteinu p130Cas



Obr. 5.8: SH3 doména p130Cas s ligandem II. třídy (PPPKPPR). Zabarvení povrchu SH3 domény podle zastoupení prvků: C, H, N, O. Zabarvení peptidu podle C, H, N, O. Zvýrazněn Tyr12 (číslování myši) v SH3 doméně p130Cas. Vyobrazeno a vymodelováno pomocí programu PyMOL verze 1.4.1 (viz před).

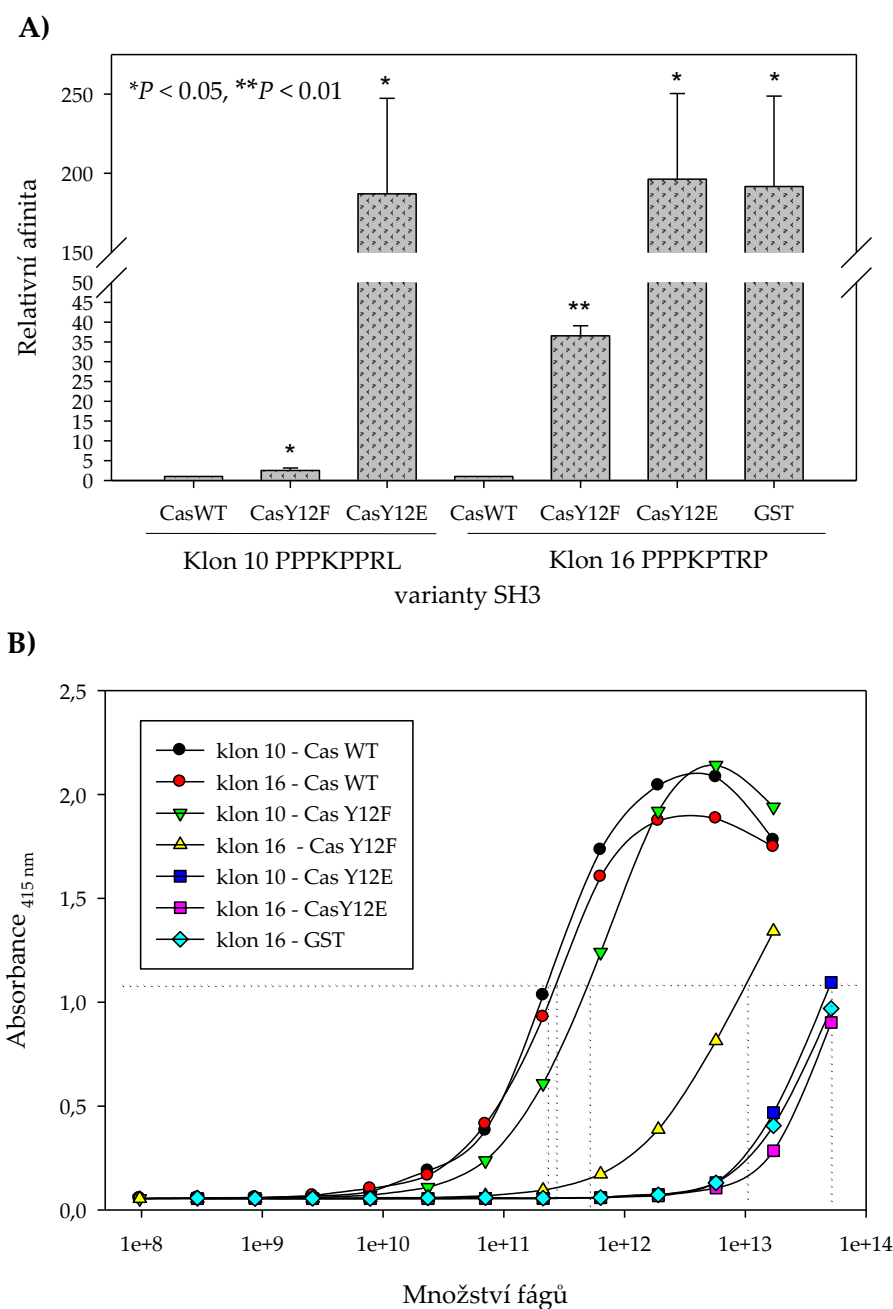
Sekvence získané z analýzy Phage display s SH3 doménou kinázy Src patří mezi ligandy I. třídy (Obr. 5.7A), zatímco SH3 domény p130Cas mezi ligandy II. třídy (Obr. 5.8). Analýza vlivu fosfomimikující mutace Tyr12 SH3 domény p130Cas by nám tedy také ukázala, zdali má obecně fosfomimikující mutace podobný účinek na obě třídy ligandů. Analyzovali jsme tedy vliv mutací Tyr12 na relativní afinitu ligandu.

Nejlépe se vázající sekvence PPSKPPLP (zkráceně) klonu 1 vykazovala (podobně jako ligand I. třídy SH3 domény Src) zeslabení vazby o 3 řády (asi 1000 krát) k fosfomimikující variantě SH3 domény p130Cas variantou v porovnání s nemutovanou, čímž prakticky zcela znemožňuje vazbu. K našemu překvapení ale fenyalaninová mutace mimikující nefosforylovatelný stav tyrosinu snižovala také radikálně afinitu (asi 25x; Graf 5.6).



Graf 5.6: Relativní afinita sekvence FHAPPSKPPLPK (klon 1) k variantám SH3 domén p130Cas. Varianty SH3 domén proteinu p130Cas s mutovaným Tyr12 (WT, Y12F, Y12E) fúzované s GST (konc. 50 µg/ml) byly imobilizovány hydrofobní interakcí na dně jamky 96-jamkové destičky a následně titrovány ředící řadou klonu fága 1. Navázané fágy jsme pak detekovali protilátkou anti-M13 konjugovanou s peroxidázou (HRP). **A)** Kvantifikace relativních afinit klonu 1 k různým variantám p130Cas SH3 domén. Relativní afinita vztažena k vazbě klonu 1 na nemutovanou doménu WT (=1) a vypočtena na základě poměrů počtu fágů potřebných pro poloviční vyvázání imobilizovaných variant SH3 domén p130Cas fúzovaných s GST (viz B, tečkované čáry). Data vyhodnocena ze 4 nezávislých opakování a ukázána jako průměr + směrodatná odchylka. **B)** Repräsentativní graf relativních afinit. Afinita fágů klesá zleva doprava (osa x vynesena v logaritmickém měřítku). Negativní kontrolu (viz GST) představuje samotná GST doména inkubovaná s fágem 1. *Grafy byly vytvořeny v programu Sigmaplot verze 11.0*

Pokles vazby sekvence **FHAPPSKPPLPK** k SH3 doméně nesoucí mutaci Y12F nás přiměl provést průzkum aminokyselinového zastoupení v motivu ALYD mezi SH3 doménami. Porovnáním sekvencí vybraných SH3 domén jsme zjistili, že některé SH3 domény (např. Crk, Grb2, PLC γ) mají v motivu ALYD místo tyrosinu fenylalanin. Přítomnost fenylalaninu u SH3 domény proteinů Crk (N-koncová), Grb2 (C-koncová) a proteinu PLC γ naznačují, že tyrosin a fenylalanin v této pozici mají podobnou funkci. My však pozorovali změnu afinity sekvence **FHAPPS₁KPPLPK** lišící se především přítomností serinu v pozici 1 od ostatních vazebných sekvencí známých interakčních partnerů SH3 domény p130Cas, u kterých fenylalaninová mutace nesnižuje pokles vazby v experimentech s koprecipitovanými proteiny PTP-PEST či FAK (Janostiak et al, 2011). Proto jsme se rozhodli analyzovat vliv mutace Y12F na vazbu fágových sekvencí 10 a 16, které mají místo výše zmíněného serinu přítomný prolin. Klon 10 má navíc centrální sekvenci **PPPKPPR** shodnou s vazebnou sekvencí proteinů PTP-PEST. Vazebná analýza s klonem 10 se skutečně vážala k fenylalaninové mutantě pouze o trochu slaběji (asi 2,2x) nežli k nemutované SH3 doméně p130Cas. Na druhou stranu klon 16 (zkráceně **PPPKPT₄RP**) s threoninem na pozici 4 se choval podobně jako klon 1 ([viz Graf 5.7](#)). Tato pozorování naznačují komplexitu vazby SH3 domény p130Cas s jejími ligandy, kdy záměna jedné aminokyseliny vedoucí k malé změně vazebného povrchu SH3 domény p130Cas vede k rozsáhlému posunu či přetočení kostry interagujícího polypeptidu.



Graf 5.7: Relativní afinita sekvence TMTPPPKPRLI (klon10) a AHTPPPKPTRPP (klon 16) k variantám SH3 domén p130Cas. Varianty SH3 domén proteinu p130Cas s mutovaným Tyr12 (WT, Y12F, Y12E) fúzané s GST (konc. 50 µg/ml) byly imobilizovány hydrofobní interakcí na dně jamek 96-jamkové destičky a následně titrovány ředící řadou klonu fága 1. Navázané fágy jsme pak detekovali protilátkou anti-M13 konjugovanou s peroxidázou (HRP). **A)** Kvantifikace relativních afinit klonu 10 a 16 k variantám Tyr12 u SH3 domény p130Cas. Relativní afinita vztažena k vazbě klonu 16 či 10 na nemutovanou variantu WT (= 1; klon 10 a 16 mají téměř shodnou afinitu k WT) a vypočtena na základě poměrů počtu fágů potřebných pro poloviční vyvázání imobilizovaných variant SH3 domén p130Cas fúzovaných s GST (viz B, tečkované čáry). Data vyhodnocena ze 3 nezávislých opakování a ukázána jako průměr + směrodatná odchylka. **B)** Reprezentativní graf relativních afinit. Afinita fágů klesá zleva doprava (osa x vynesena v logaritmickém měřítku). Negativní kontrolu (viz GST) představuje samotná GST doména inkubovaná s fágem 16. *Pozn.: Poklesu vazby klonu 10 a 16 k fosfomimikující mutaci nebylo možno dosáhnout jako u klonu 1, neboť pokles 200krát dosahoval úrovně nespecifity (viz GST).* **Grafy byly vytvořeny v programu Sigmaplot verze 11.0**

5.4. Hledání nových interakčních partnerů SH3 domény proteinu p130Cas

Na základě námi anotovaného vysokoafinitního motivu [AP]-P-[APMS]-K-P-[LPST]-[LR]-[LPST] jsme pomocí algoritmů BLASTP a PATTINPROT našli v lidské databázi UNIPROT-SWISSPROT celkem 16 unikátních proteinů. Z nich u 6 již byla interakce s SH3 doménou p130Cas známa a u dalších šesti (žlutě v tabulce) se nám povedlo najít v literatuře možné funkční propojení se signalizací, kterých se účastní p130Cas (Tab. 5.1). Nalezené sekvence odpovídají sekvencím tvořící PPII helixy, které se často nacházejí na povrchu globulárních proteinů, kde tvoří flexibilní smyčky (shrnuje v Holt and Koffer, 2001). To zvyšuje pravděpodobnost, že by nalezené sekvence byly na povrchu struktury proteinů, a byly tak přístupné vazbě SH3 domény p130Cas.

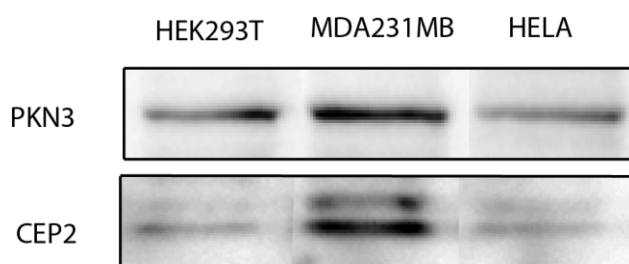
Jméno proteinu	Sekvence	Interakce s SH3 p130Cas
C15oRf62	A ₇₈ P P K P P R L	?
C1oRf168	P ₂₇₈ P P K P S R P	?
CEP2	A ₁₂₆ P P K P P R L	?
DOK7	P ₃₁₇ P P K P L R P	?
FBN2	P ₃₃ P P K P P R P	?
GLIS2	P ₃₃₃ P P K P P L P	?
MICAL1	P ₈₂₉ P P K P P R S	Známá
PKN3	P ₅₀₉ P P K P P R L	?
PRAM1	P ₅₀₁ P A K P P L P	?
FAK	A ₇₁₁ P P K P S R P	Známá
PYK2	P ₇₁₃ P P K P S R P	Známá
PTP-PEST	P ₃₃₃ P P K P P R T	Známá
C3G	A ₂₆₆ P P K P P L P	Známá
SETD5	P ₆₀₆ P A K P S R P	?
VCL	A ₈₅₉ P P K P P L P	Známá
WNK1	A ₁₇₅₀ P S K P P L T	?

Tab. 5.1: Kandidátní proteiny pro vazbu SH3 domény p130Cas. Žlutě jsou znázorněny proteiny, které sdílejí signalizaci s proteinem p130Cas.

Pro další práci a ověřování interakcí s SH3 doménou p130Cas jsme zvolili proteiny PKN3 a CEP2, kteří mají výše popsanou polyprolinovou sekvenci konzervovanou v ortologních proteinech savců, vykazují funkční propojení se signalizací p130Cas a jsou vhodné svou velikostí (< 100 kDa) pro další práci.

5.4.1. Ověření vazby kandidátních proteinů s p130Cas

Abychom mohli ověřit interakce mezi CEP2, PKN3 a p130Cas, porovnali jsme úroveň jejich exprese v lidských buněčných liniích HEK293T, MDA-231MB a HELA (Obr. 5.9). Z těchto třech linií vykazovaly CEP2 a PKN3 nejvyšší expresi v buněčné linii rakoviny prsu MDA-231MB. Z lyzátů buněk MDA-231MB jsme následně ověřovali interakce s celým p130Cas či pouze s jeho SH3 doménou.



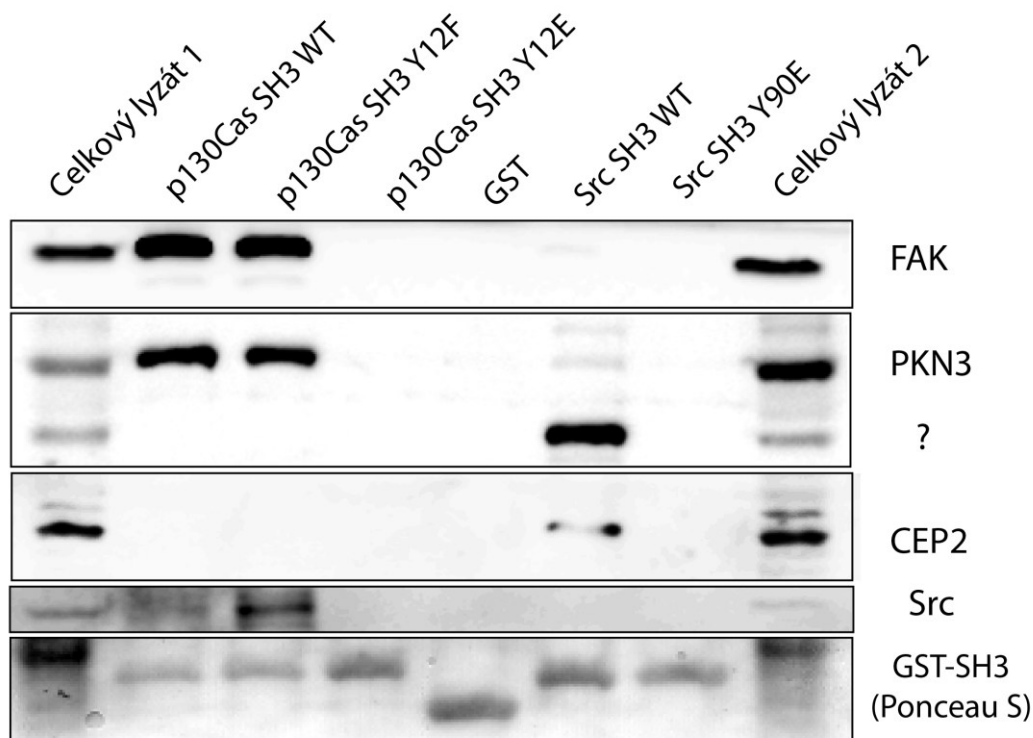
Obr. 5.9. Porovnání exprese PKN3 a CEP2 ve vybraných buněčných liniích. Lyzáty z buněčných linií HEK293T, MDA-231MB a HELA byly srovnány na stejnou koncentraci. Následně v nich pomocí imunoblotu byla identifikována exprese PKN3 a CEP2 (spodní band).

5.4.1.1. Interakce kandidátních proteinů s SH3 doménou p130Cas

Pro ověření interakcí jsme nejprve zvolili vazebné pokusy, tzv. „pull down“ experimenty, při kterých jsme se pokusili vyvázat proteiny CEP2 a PKN3 z lyzátů buněk MDA-231MB přes varianty SH3 domén p130Cas imobilizovaných na GSH-sepharóze. Vyvázané proteiny jsme podrobily imunodetekci na nitrocelulózové membráně (po SDS-PAGE a Westernblot). Tyto experimenty ukázaly, že protein PKN3 specificky interaguje s nemutovanou formou a fenylalaninovou Y12F mutantou SH3 domény p130Cas, zatímco s fosfomimikující mutací Y12E či samotnou GST neinteragují (Obr. 5.10). U proteinu CEP2 jsme nebyli schopni detekovat signál s SH3 doménou p130Cas, ale k našemu překvapení interagoval s SH3 doménou kinázy Src, kterou jsme v experimentu použili jako nezávislou negativní kontrolu. SH3 doména Src byla také, ač slabě, schopná vyvázat protein PKN3 a FAK. Tyto interakce budou vzhledem k velmi slabé intenzitě signálu nejspíše nepřímé přes protein p130Cas. SH3 doména kinázy Src se totiž váže k p130Cas

přes jeho sekvenci RPLPSPP (Nakamoto et al., 1996). My jsme navíc byly schopni detekovat Src po inkubaci s variantami SH3 WT a YF p130Cas, a to navzdory tomu, že interakce SH3 domény p130Cas se Src není popsána (viz Obr. 5.10).

Ačkoliv u PKN3 nejsou známy žádné izoformy, protilátka rozpoznávala na gelu protein PKN3 jako dva bandy, z nichž horní odpovídá molekulové hmotnosti PKN3. Spodní band se specificky nabohacoval u nemutované varianty SH3 domény kinázy Src.

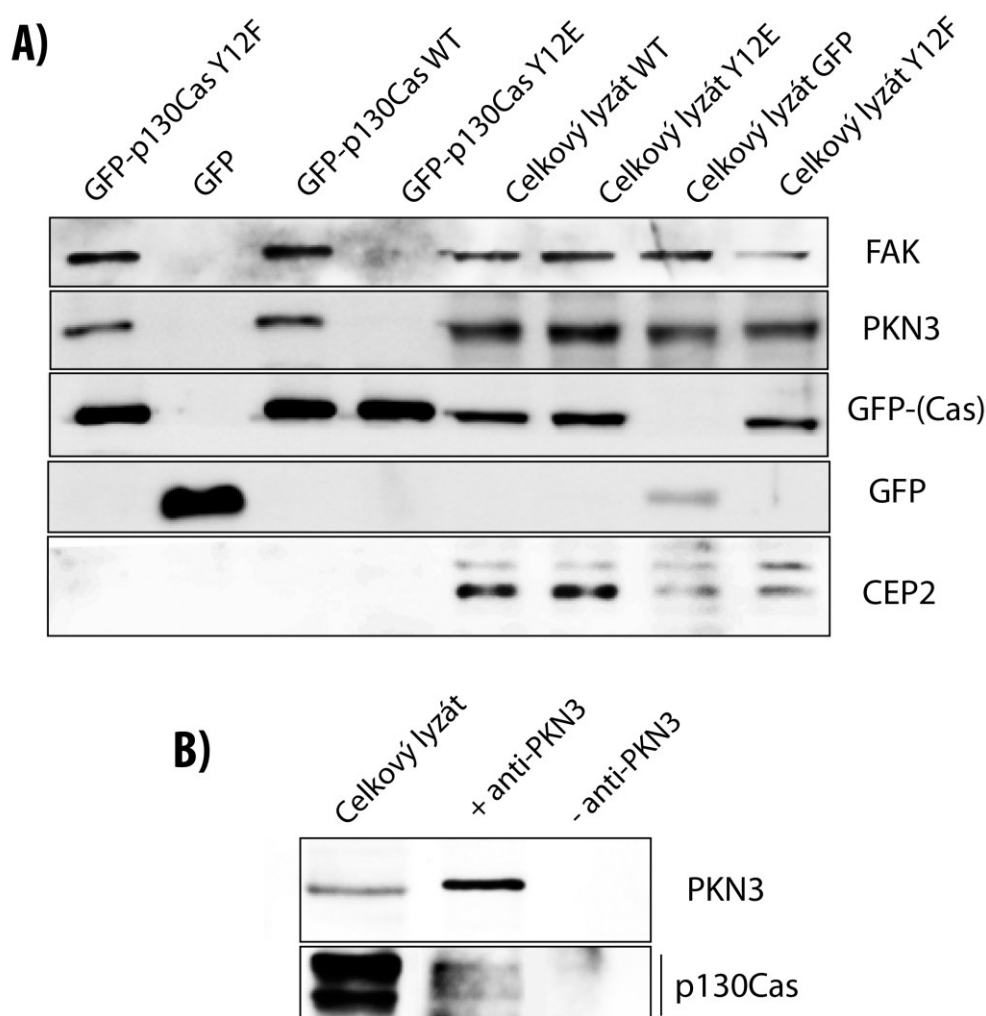


Obr. 5.10: Vazebná analýza s SH3 doménami p130Cas a Src. Varianty SH3 domén p130Cas a kinázy Src imobilizované na GSH-sefaroze byly inkubovány s lyzáty buněk MDA-231MB. Vyvázání interakční partneri p130Cas byli detekováni na imunoblotu. Protein FAK představuje pozitivní kontrolu úspěšného experimentu, neboť jeho vazba k SH3 Cas je již známa. Negativní kontrolu představuje samotné GST, pozitivní celkový lyzát. Ukázány reprezentativní imunoblotty získané alespoň ze třech nezávislých experimentů.

5.4.1.2. Interakce kandidátních proteinů s celým proteinem p130Cas

Po úspěšném vyvázání PKN3 přes SH3 doménu p130Cas jsme se pokusili potvrdit interakci i s celým proteinem p130Cas. V naší laboratoři byly již dříve za podobným účelem vytvořeny plazmidy kódující GFP protein fúzovaný s variantami proteinu p130Cas (WT, Y12F, Y12E; Janostiak et al, 2011). Lyzáty z buněk MDA-231MB transfekovaných těmito konstrukty pak umožnily selektivní vychytání p130Cas přes anti-GFP protilátku, protein A-sefaroze a následnou imunodetekci koprecipitovaných endogenních interakčních

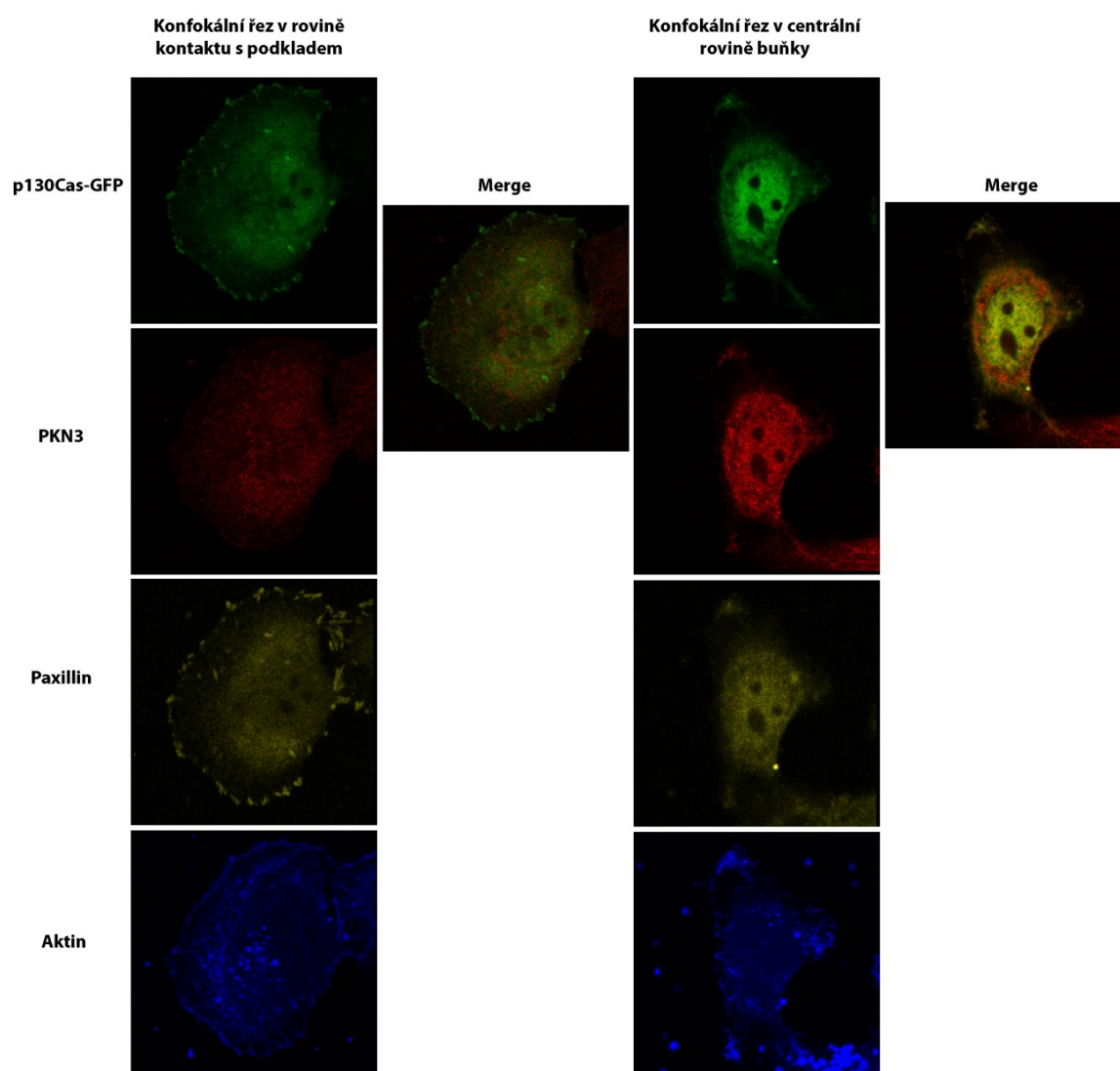
partnerů. Očekávaně protein p130Cas, i fenylalaninový mutant Y12F, vyvázali z lyzátu protein PKN3, zatímco mutace Tyr12 za Glu zrušila interakci i s celým proteinem p130Cas. Naproti tomu protein CEP2 opět neinteragoval s p130Cas (Obr. 5.11A). Abychom potvrdili interakci mezi PKN3 a p130Cas, provedli jsme i obrácenou koimunoprecipitaci p130Cas (endogenního) přes protilátku proti endogennímu PKN3. Po precipitaci proteinu PKN3 z lyzátů buněk MDA-MB231 jsme detekovali koprecipitovaný p130Cas (viz Obr. 5.11B).



5.11: Potvrzení interakce p130Cas s PKN3. Reprezentativní imunoblotty získané alespoň ze třech nezávislých experimentů. **A)** Protein p130Cas-GFP byl imunoprecipitován přes anti-GFP protilátku z lyzátů buněk MDA-231MB transfekovaných variantami Tyr12 p130Cas a následně protilátka anti-GFP vychytána protein A-sefárovou. Vyvázání interakční partneri p130Cas byli detekováni na imunoblotu. Protein FAK představuje pozitivní kontrolu úspěšného experimentu, neboť jeho vazba k p130Cas (WT či Y12F) je již známa. Pozitivní kontrolu představují totální lyzáty transfekované různými variantami p130Cas s GFP, negativní samotným GFP. **B)** K lyzátu buněk MDA-231MB přidáno 10 μ l protilátky anti-PKN3 (+ anti-PKN3). Tato protilátka byla následně precipitována pomocí protein-A sefárovou a koprecipitovaný p130Cas detekován na imunoblotu. Pozitivní kontrolu představuje totální lyzát, negativní imunoprecipitace bez protilátky anti-PKN3 (- anti-PKN3). Protein p130Cas se v buňkách MDA-231MB vyskytuje ve své hyper (horní band) a hypofosforylované formě (spodní band).

5.4.1.3. Kolokalizace p130Cas s PKN3

Pro interakci dvou proteinů v buňce je důležitá i jejich buněčná lokalizace. PKN3 se hojně exprimuje v buňkách HELA, které jsou pro imunofluorescenci díky své morfologii vhodnější než buňky MDA-231MB. Buňky HELA jsme transfekovali GFP-p130Cas fúzním konstruktem. Protein P130Cas s PKN3 kolokalizoval v jádře a perinukleární oblasti, společný signál jsme detekovali i v lamelipódiích, ale ne ve fokálních adhezích (Obr. 5.12).



Obr. 5.12: Kolokalizace p130Cas s PKN3 v buňkách HELA. Buňky HELA transfekované GFP-p130Cas(WT) a uchycené na fibronectinu byly fixovány a intracelulární lokalizace uvedených proteinů detekována fluorescenčně: GFP-p130Cas (GFP *zeleně*), PKN3 - Alexa Fluor 546 (*červeně*), Paxillin (marker fokálních adhezí) – Alexa Fluor 633 (*žlutě*), F- aktin – faloidin 405 (*modrý*). Série Merge ukazuje proložení signálu GFP-p130Cas a PKN3.

6. Diskuze

Tato práce poprvé detailně popisuje vazebný motiv SH3 domény proteinu p130Cas (A/PPxKPxL/R) experimentálně získaný metodou Phage display a charakterizuje význam jednotlivých aminokyselin vazebného motivu pro vazbu na SH3 doménu p130Cas. Na základě této anotace, rešeršní analýzy a následné imunoprecipitace se nám povedlo identifikovat dosud nepopsaného interakčního partnera SH3 domény p130Cas, a to kinázu PKN3. Tento úspěch naznačuje, že náš přístup lze zdárně aplikovat pro popsání nových vazebných partnerů i jiných proteinů.

6.1. Charakterizace vazebného motivu SH3 domény p130Cas

SH3 doména proteinu p130Cas patří díky vazebnému motivu mezi netradiční SH3 domény. Analýzou Phage display se nám povedlo detekovat u všech klonů centrální lysin ohraničený dvěma klíčovými proliny (**PxK₂P**) a kotvící Leu/Arg (**PxKPxL/R₅**). Ale u proteinů, u kterých byla interakce s SH3 doménou p130Cas popsána, jako je např. PTP1B, se uplatňují i jiné bazické AK na pozici 2 a 5 (viz Tab. 2.3, str. 38). To, že jsme je nenašli pomocí analýzy Phage display indikuje, že by mohly mít nižší afinitu. Dalšími možnostmi, proč nám tyto kombinace unikly, by mohlo být zapříčiněno nedostatečnou komplexitou fágové knihovny ($2,7 \cdot 10^9$) nebo negativním vlivem argininu nacházejícího se v této sekvenci na infektivitu fága M13, které tyto klony znevýhodňuje v kompetici s ostatními (Peters et al., 1994). Obdobnou preferenci pro centrální bazickou aminokyselinu mají i SH3 domény proteinů GRAF1, GRAF2, Amphiphysin1 a ASAP2 (Carducci et al., 2012; Grabs et al., 1997).

Analýza vazebného motivu SH3 domény p130Cas ukázala kromě esenciálního motivu P₀xKP silnou preferenci pro prolin na pozici -1, v této pozici toleruje také alanin (viz klon 4, potvrzený interakční partner C3G a Vinculin). Ačkoli měl klon 4 se sekvencí A₁PAKPSLWL velice sníženou afinitu k SH3 doméně p130Cas oproti sekvencím s prolinem na pozici -1, za pokles této afinity pravděpodobně není zodpovědný zmiňovaný alanin. Sekvence A₁PPKPFRN (klonu 13) vykazovala totiž daleko lepší afinitu než (klon 15) P₁PGKPLRS (*dvoje opakování, neukázané výsledky*). Navíc kompetiční analýzy ukázaly, že C-koncová sekvence [A₁]PPKPSRP kinázy FAK vykazuje přibližně stejnou afinitu k SH3 doméně p130Cas jako C-koncová sekvence [P₋₁]PPKPSRP kinázy PYK2

(Ohba et al., 1998).

Rozdíl relativních afinit mezi jednotlivými sekvencemi fágů nelze vzhledem ke komplexitě vazby SH3 domény ke svým ligandům přiřadit pouze na základě jedné rozdílné aminokyseliny, která je součástí PPII helixu (asi 8 AK), neboť se na výsledné afinitě pravděpodobně podílí i okolní aminokyseliny (viz pozice -4,-3,-2 a 7). Avšak souhrnná charakterizace motivu SH3 domény p130Cas na základě více různých fágů naznačila odlišný vliv polárních aminokyselin, především serinů a threoninů, v různých pozicích oligopeptidu. Serin na pozici -1 polypeptidu (S₁PTKPPLPI; viz klon 11) afinitu pravděpodobně výrazně snižoval, zatímco u serinu na pozici +1 lze na rozdíl od threoninu (PS/T₁KP) vyvodit pozitivní vliv na výslednou sílu vazby. Serin v umístění +1 by totiž mohl tvořit přídatnou elektrostatickou interakci s Asn56, zatímco threonin peptidu se do úzkého kanálu mezi Asn56 a Arg57 nejspíše nevejde (viz Obr. 2.9, str. 35). Překvapivě fágové 1 a 16 lišící se oproti jiným sekvencím přítomností serinu na pozici +1 a threoninu na pozici 4 mají drasticky sníženou afinitu k fenylalaninové mutantě Y12F SH3 domény p130Cas oproti nemutované, přestože jsou zmiňované polární aminokyseliny při interakci velmi vzdáleny od mutovaného tyrosinu. Proliny peptidu (klíčový prolin v pozici 0, P₀xKP) kromě hydrofobních interakcí pravděpodobně tvoří vodíkový můstek s hydroxylovou skupinou tyrosinu SH3 domény, fenylalaninová mutace pak tyto můstky ruší (Schobert and Tschesche, 1978). To by vysvětlovalo mírný pokles vazby (asi dvakrát) sekvencí PPPKPPRL a RPLPPLP k fenylalaninovým mutantám SH3 domén p130Cas a Src oproti původním formám. Nepřítomnost vodíkového můstku mezi tyrosinem domény a prolinem peptidu pravděpodobně způsobí i mírné pootočení kostry PPII helixu polyprolinového ligandu a v případě sekvencí PPSKPPLP a PPPKPTRP by tato změna mohla vést ke sterickým kolizím serinu a threoninu s vazebným povrchem SH3 domén. Pravděpodobně také dochází k přeuspořádání vodního obalu kolem prolinů vazebného peptidu. Molekuly vody se pevně váží k SH3 doménám, a zprostředkovávají tak interakci vazebného peptidu s SH3 doménou a jakékoli jejich přeuspořádání může mít na výslednou sílu vazby vliv (Martin-Garcia et al., 2012).

Výsledek z experimentu Phage display dále naznačuje preferenci SH3 domény p130Cas pro histidin umístěný N-koncově od vlastní polyprolinové sekvence na pozici -3. Tyto histidiny by mohly zvyšovat afinitu jednotlivých sekvencí podobně, jako se to ukázalo u fágů získaných z analýzy Phage display s SH3 doménou Lck (Tran et al., 2005). Podobný výsledek byl v naší laboratoři již dříve pozorován u SH3 domény kinázy Src, avšak zde nebyla přesná pozice histidinu příliš konzervována (Sztacho, diplomová práce

2009). Tyto histidiny by mohly tvořit přídatné smyčky mimo PPII helix. Oblast bohatá na histidiny získaná z Phage display s SH3 doménami Lck, Src, p130Cas naznačuje, že tento jev je buď charakteristický pro více SH3 domén, anebo se jedná o artefakt vzniklý uspořádáním experimentu Phage display (fágová knihovna Ph.D. 12TM Biolabs). Druhá možnost je asi více pravděpodobná, neboť oblast bohatá na histidiny není pozorována u interakčních partnerů těchto SH3 domén, ani u jiných experimentů Phage display uskutečněných s odlišnou fágovou knihovnou.

Strategie v objevování peptidových ligandů bohatých na proliny sloužících jako inhibitory SH3 domén vyžaduje popsání přídatných interakcí, neboť obvykle je afinita těchto peptidů či selektivita domén nízká. Naše výsledky naznačují, že serin na pozici 1 (PPS₁KPPLP, EC₅₀ = 365 nM) by mohl zvyšovat afinitu i k jiným SH3 doménám mající tyrosin v sekvenci ALYD (ale ne F) a podobnou specifitu jako SH3 doména p130Cas. Jak již bylo zmíněno SH3 doména Amphiphysinu1 má podobnou specifitu jako p130Cas. Obě tyto SH3 domény pravděpodobně váží stejnou sekvenci VPS₁RPNRA na proteinu Dynamin1 (Grabs et al., 1997; Kang et al., 2011). Vazba SH3 domény Amphiphysinu1 s Dynaminem1 je charakterizována vysokou afinitou pro SH3 domény – 190 nM (Grabs et al., 1997). Za tuto vysokou afinitu by mohl být částečně zodpovědný právě serin na pozici 1. Nami předpovězená sekvence kandidátního interakčního partnera SH3 domény p130Cas, kinázy WNK1, má serin v této poloze také umístěný (viz Tab. 5.1, str. 99). To jí potenciálně předpovídá vysokou afinitu.

Charakterizace vazebného motivu SH3 domény p130Cas poprvé, na této doméně, ukázala obměnu kotvící aminokyseliny argininu za leucin. Tato záměna pravděpodobně nemá na výslednou afinitu významnější vliv. Zatímco u kotvícího argininu se uplatňují elektrostatické interakce s Glu19 a hydrofobní s Trp41, leucin by mohl tvořit hydrofobní interakci s Ile 52 a Trp41 nacházející se ve třetím vazebném žlábků SH3 domény p130Cas (viz Obr. 5.5, str. 91). Protein C3G a v naší laboratoři potvrzený Vinculin mají kotvící leucin v sekvenci zodpovědné za vazbu k SH3 doméně p130Cas a tyto interakce lze označit za silné. My jsme předpověděli navíc např. Ser/Thr kinázu WNK1, adaptorový protein PRAM1 podporující aktivaci kinázy JNK a transkripční faktor GLIS2 podílející se na řízení sekrece enzymů degradujících extracelulární hmotu podobně jako protein CIZ (viz kapitola 2.1.5.3.4, str. 41). Potvrzení těchto interakcí by tedy bylo nadmíru zajímavé, nicméně kapacita naší laboratoře neumožňuje další charakterizaci těchto možných interakcí.

V naší laboratoři byla dříve předpovězena hypotéza, že fosfomimikující mutace

tyrosinu ze sekvence ALYD (Tyr12 p130Cas, Tyr90 Src) ruší vazbu SH3 domén k ligandům II. třídy více než u ligandů I. třídy (Sztacho, diplomová práce 2009). My měli k dispozici vysokoafinitní ligandy II. třídy proteinu p130Cas a ligandy I. třídy kinázy Src. Pomocí měření relativních afinit se nám povedlo ukázat, že fosfomimikující mutace snižuje interakci u obou typů ligandů (PPSKPPLP (II. třída) a RPLPPLP (I. třída)) přibližně stejně o 3 řády (viz Graf 5.5, str. 91; Graf 5.6, str. 92) a tím ji prakticky ruší. U sekvencí vázajících se s nižší afinitou k SH3 doméně p130Cas jsme nebyli schopni stejného poklesu dosáhnout kvůli nutnosti použít vysoké koncentrace fágů, při kterých však docházelo k výraznému zvýšení jejich nespecifické vazby. Náš reprezentativní model SH3 domény p130Cas s vymodelovaným peptidem na základě homologie s ligandem II. třídy SH3 domény Crk také potvrdil, že fosfomimikující mutace vnáší záporný náboj, který změnou povrchu připomíná fosforylovaný stav a blokuje vazbu ligandu.

6.2. Funkční význam potvrzených interakcí SH3 domény p130Cas

Lidská proteinová databáze UNIPROT-SWISSPROT (květen 2012) registruje okolo 20 000 zkontrolovaných protein-kódujících genů, které dávají vznik proteinům s odlišnou primární strukturou. Počet těchto proteinů při průměrné délce 300 AK nemůže ani zdaleka pokrýt všechny možné kombinace 8 AK dlouhého polypeptidu (20^8). Námi předpovězený 8 aminokyselin dlouhý motiv [AP]-P-[APMS]-K-P-[LPST]-[LR]-[LPST] s redundancí na místech označených hranatou závorkou ($20^8/256$) by tedy při náhodném zastoupení AK v sekvencích proteinů měl teoreticky vést k nalezení maximálně jednoho proteinu. My jich však předpověděli 16. To naznačuje, že tyto polyprolinové sekvence jsou mezi proteiny silně konzervované. Některé z proteinů mající tyto sekvence jsou již ověřeny jako interakční partneři SH3 domény proteinu p130Cas a překvapivě 2 z 10 nepotvrzených patří mezi Ser/Thr kinázy. U jedné z těchto kináz, kinázou PKN3, jsme ověřili interakci, a to jak s SH3 doménou, tak s celým proteinem p130Cas.

SH3 doména p130Cas se nepostradatelně podílí na regulaci tyrosinové fosforylace celého proteinu (viz kapitola 2.1.1, str. 15) a nedávno se ukázalo, že tato doména je důležitá i pro serinovou fosforylaci indukovanou proteiny BCAR3 (Makkinje et al., 2009). Dosud nebyla identifikována žádná Ser/Thr kináza fosforylující p130Cas na serinech. Kináza PKN3 patří do rodiny Ser/Thr kináz PKN, které regulují aktinový cytoskelet, transkripci, buněčný cyklus a podílejí se na procesech vedoucích k buněčné transformaci

a tvorbě metastáz (Dong et al., 2000; Hall, 2009; Vincent and Settleman, 1997). Od jejich dalších dvou členů PKN1 a PKN2 se liší především přítomností dvou unikátních polyprolinových sekvencí mezi katalytickou doménou a N-terminální části proteinu, z nichž jsme jednu identifikovali jako potenciální místo vazby SH3 domény p130Cas. Kináza PKN3 se exprimuje specificky v nádorových tkáních a buněčných liniích (např. MDA-231B, HELA; Lachmann et al., 2011; Oishi et al., 1999). Její exprese roste obdobně jako p130Cas v invazivních liniích rakoviny prsu a stejně jako p130Cas přispívá k invazivnímu charakteru těchto buněk v 3D podmínkách (Brabek et al., 2004; Leenders et al., 2004; Near et al., 2007; Unsal-Kacmaz et al., 2011). U myši pak kináza PKN3 zprostředkovávala růst nádorů prostaty indukovaných aktivovanou kinázou PI3K (Leenders et al., 2004). Podobně i protein p130Cas je nutný pro růst nádorů prsu vyvolaných aktivovanou PI3K (Pylayeva et al., 2009). To naznačuje, že interakce PKN3-p130Cas by mohla mít spíše patologický význam a nebude se uplatňovat za normálního fyziologického stavu. To slibuje možnost inhibice této interakce selektivně v nádorových buňkách, zatímco by zůstaly zdravé buňky neovlivněné. V následujících odstavcích budou naznačeny potenciální významy interakce PKN3-p130Cas podložené fakty z různých zdrojů ([viz Obr. 6.1, str. 113](#)).

Interakce mezi kinázou a jejím substrátem často částečně závisí na interakci katalytické domény kinázy s fosforylačním motivem substrátu. Zjednodušený motiv PKN3 je [RIS]-[SIR]-R₃-[SRI]-[SI]-pS₀-[ISR] (pS₀ – fosforylovaný serin; S – neutrální AK (Ser, Gly, His, Thr, Ala, Pro); I – hydrofobní AK; R – hydrofilní AK, na pozici -3 je většinou Arg (Lys); *AK v hranatých závorkách jsou napsány postupně dle pravděpodobnosti výskytu*; Collazos et al., 2011). V sekvenci lidského proteinu p130Cas se nachází celkem 6 míst potenciálně vhodných pro fosforylaci kinázou PKN3, z nichž nejvíce odpovídají fosforylačnímu motivu PKN3 tři seriny nacházející se v doméně p130Cas bohaté na seriny: Ser569 (AGRGGpSG), Ser494 (SWRSPpSE), Ser428 (EGKRLpSA; [viz Tab. 2.2, str. 27](#)). První z nich Ser569 nemá konzervované okolní aminokyseliny mezi myši a člověkem, a proto mu nepřikládáme velký význam. Fosforylovaný Ser494 společně s ohraničujícími aminokyselinami vytváří vazebné místo pro proteiny rodiny 14-3-3 ([viz kap.2.1.4.2, str. 31](#)), zatímco defosforylace Ser/Thr fosfatázami (např. PP2A) ji ruší (Briknarova et al., 2005; Yokoyama and Miller, 2001). Jedním z nejlépe prozkoumaných proteinů této rodiny je protein 14-3-3ζ. Tento protein se stejně jako p130Cas a PKN3 nadprodukuje v buněčných liniích rakoviny prsu, a pravděpodobně tak zvyšuje jejich buněčnou migraci a proliferaci (shrnuto v Tzivion et al., 2006). Navíc 14-3-3ζ váže kinázu PI3K, která

indukuje aktivaci PKN3, a způsobuje její translokaci k membráně (Neal et al., 2011). Ser494 by ale také mohl být fosforylován kinázou regulovanou buněčným cyklem AuroraA, u níž byla popsána asociace s proteinem Nedd9, blízkce příbuzným p130Cas. Tato kináza by měla mít dle predikce vysokou preferenci k motivu v okolí Ser494 ([viz http://phosphonet.ca](http://phosphonet.ca)). Výše zmíněná asociace s Nedd9 zatím vedla k identifikaci fosforylace na Ser296 (Pugacheva and Golemis, 2005)

Třetí fosforylační místo představuje Ser428, jehož fosforylace in vivo již byla ověřena hmotnostní analýzou (Christensen et al., 2010). Význam této fosforylace dosud není známý. Ser428 je homologní s Ser369 proteinu Nedd9 a sdílí s ním i fosforylační motiv pro PKN3 ([viz Tab. 2.2, str. 27](#)). Fosforylovaný Ser369 cílí Nedd9 k ubiquitinilaci a následné degradaci proteasomem (Hivert et al., 2009). SH3 doména p130Cas je vysoce homologní s SH3 doménou Nedd9, zároveň bylo popsáno mnoho shodných interakčních partnerů, proto lze očekávat také interakci PKN3 s Nedd9 a případnou fosforylaci Ser369. Dosud nebyla identifikována kináza zodpovědná za fosforylaci Ser369, pouze se povedlo vyloučit Ser/Thr kinázy Aurora A, Aurora B, Mek1, Chk1 a p90Rsk (Hivert et al., 2009). Mechanismus degradace Nedd9 spřažený s fosforylací Ser369 není dosud objasněn, ale Nedd9, preferenčně jeho hyperfosforylovaná forma na Ser/Thr, interaguje s proteinem Smad3, který podporuje asociaci Nedd9 s různými E3 ubiquitin ligázami (Liu et al., 2000; Nourry et al., 2004). Fosforylovaný p130Cas také váže Smad3, ale na rozdíl od Nedd9 vykazuje v buňce stabilní expresi a není podobně jako Nedd9 degradován v průběhu buněčného cyklu (Kim et al., 2008; Law et al., 1998). Navíc, jak bylo zmíněno výše, oba proteiny PKN3 a p130Cas jsou vysoce exprimovány v invazivních buňkách rakoviny prsu (MDA-231MB versus MCF-7; Lachmann et al., 2011; Near et al., 2007).

Proteiny z rodiny NSP ([viz kapitola 2.1.4.1, str. 28](#)), konkrétně myši hematopoetická izoforma CHAT (CHAT-H) a lidský BCAR3, indukují v buňce serinovou fosforylaci proteinů rodiny Cas (Nedd9 a p130Cas; Makkinje et al., 2009; Regelman et al., 2006; Vanden Borre et al., 2011). Tato fosforylace byla detekována na základě pozorování posunů p130Cas a Nedd9 na polyakrylamidovém gelu (PAGE), kde se objevují jako 2 bandy těsně nad sebou. Nabohacení horního bandu se ukázalo být specifické pro formu Nedd9 i p130Cas hyperfosforylovanou na serinech. Následná mutagenese v doméně bohaté na seriny ukázala, že tento posun způsobují fosforylované seriny v sekvenci Nedd9 mezi 369-396 (tomu odpovídá sekvence p130Cas mezi **419-446**, číslování lidské). Cílená mutagenese Ser437 p130Cas a Ser369 Nedd9 částečně zredukovala posun proteinů Cas na gelu. Delece sekvence kódující celý tento 27 AK

dlouhý úsek pak vedla k úplné ztrátě horního bandu Nedd9 (Makkinje et al., 2009; Regelman et al., 2006). Z toho plyne, že se nepodařilo identifikovat všechny fosforylované serinové zbytky proteinů Cas, které jsou indukovány transfekcí buněk plazmidy kódujícími protein CHAT-H či BCAR3. U proteinu p130Cas by se konkrétně mohlo jednat o výše popisovaný Ser428 (homologní s Ser369 proteinu Nedd9) či Ser494 (homologní Ser chybí u Nedd9, viz Tab. 2.2, str. 27), za jejichž fosforylaci by mohla být zodpovědná kináza PKN3.

Překvapivě serinová fosforylace p130Cas vyvolaná proteinem BCAR3 v buňkách rakoviny prsu nevyžaduje na rozdíl od CHAT-H v T-lymfocytech přímou interakci s p130Cas (Makkinje et al., 2009; Regelman et al., 2006). Kináza PKN3 by tento rozpor mohla vysvětlit. V T-lymfocytech se PKN3 neexprimuje. Navíc inhibice kináz podporující aktivaci PKN3, kinázy PI3K a PDK1, nemá v T-lymfocytech na serinovou fosforylaci proteinů Cas vliv (Regelman et al., 2006). Naproti tomu v buněčných liniích rakoviny prsu MDA-231MB vede k serinové fosforylaci proteinů Cas pouze transfekce genem *bcar3*, zatímco *chat-h* ne. Navíc téměř veškerá tato fosforylace vyžaduje SH3 doménu p130Cas a je znatelnější v invazivnějších liniích rakoviny prsu (MDA-231MB v porovnání s MCF-7; Makkinje et al., 2009; Vanden Borre et al., 2011). To koreluje s vyšší expresí či aktivitou PKN3 a PI3K (Adams et al., 2011; Lachmann et al., 2011). Propojení jejich aktivit s formou p130Cas fosforylovanou na serinech naznačují i analýzy adherentních buněk *bcar3*^{-/-}. Ty vykazují ztrátu serinové fosforylace p130Cas a zároveň významný pokles PI3K signalizace (Near et al., 2009). Souhrnně tyto informace naznačují, že signalizace vedoucí k fosforylaci p130Cas na serinech je odlišná v T-lymfocytech a buňkách odvozených od rakoviny prsu, kde by se mohla uplatňovat Ser/Thr kináza PKN3.

Serinová fosforylace p130Cas může být také stejně jako tyrosinová závislá na buněčné adhezi a aktinovém cytoskeletu a ovlivňovat buněčnou morfologii (viz kapitola 2.1.4, str. 25). V kontrastu s tyrosinovou k ní ale dochází až několik hodin po adhezi. To naznačuje, že Ser/Thr kinázy se aktivují v návaznosti na tyrosinovou fosforylaci p130Cas (Makkinje et al., 2009). S tím koreluje fosfo-aminokyselinová analýza porovnávající zastoupení fosforylovaných Ser/Thr a Tyr mezi buňkami před a po transformaci konstitutivně aktivní formou tyrosinové kinázy Src. Kináza Src vyvolala kromě silného navýšení tyrosinové fosforylace i mírné navýšení serinové (Kanner et al., 1991). Naše experimenty navíc naznačují, že by PKN3 mohla interagovat, ač slabě, s kinázou Src, neboť jsme byli schopni vyizolovat PKN3 přes SH3 doménu Src (viz Obr. 5.10, str. 101).

Aktivní kináza Src podporuje interakci mezi p130Cas a kinázou PI3K v buňkách transformovaných proteinem Crk a tato interakce vede k zvýšené aktivitě PI3K (Riggins et al., 2003a). Kináza Src by mohla podporovat fosforylaci p130Cas závislou na PKN3 i jinak než přes dráhu PI3K-PKN3 (viz Obr. 6.1, str. 113). Konstitutivně aktivní kináza Src (v-Src) inhibuje fosforylaci Ser/Thr fosfatázu PP2A, jejíž inaktivace indukuje serinovou fosforylaci p130Cas (Chen et al., 1992; Yokoyama and Miller, 2001). Tuto inaktivaci podporuje nejen transfekce buněk genem *v-src* způsobující buněčnou transformaci, ale i stimulace buněk insulinem, jehož použití stimuluje aktivitu PKN3 přes PI3K (Chen et al., 1992; Chen et al., 1994; Leenders et al., 2004). Na druhou stranu aktivita kinázy Src je důležitá pro asociaci p130Cas s PP2A a stimulace insulinového receptoru vede k tyrosinové defosforylaci p130Cas (Sorokin and Reed, 1998; Yokoyama and Miller, 2001).

Kináza Src na rozdíl od p130Cas při našich vazebných analýzách velice silně vychytala i jiný protein, který protilátka anti-PKN3 silně rozpoznávala (viz Obr. 5.10 - spodní band, str. 101). Mohlo by se jednat o dosud nepopsanou izoformu PKN3 či o jednu z popsanych izoform proteinu PKN2, u něhož byla popsána interakce s SH3 doménou Nck mající podobný vazebný motiv jako SH3 doména proteinu Src (Carducci et al., 2012; Quilliam et al., 1996).

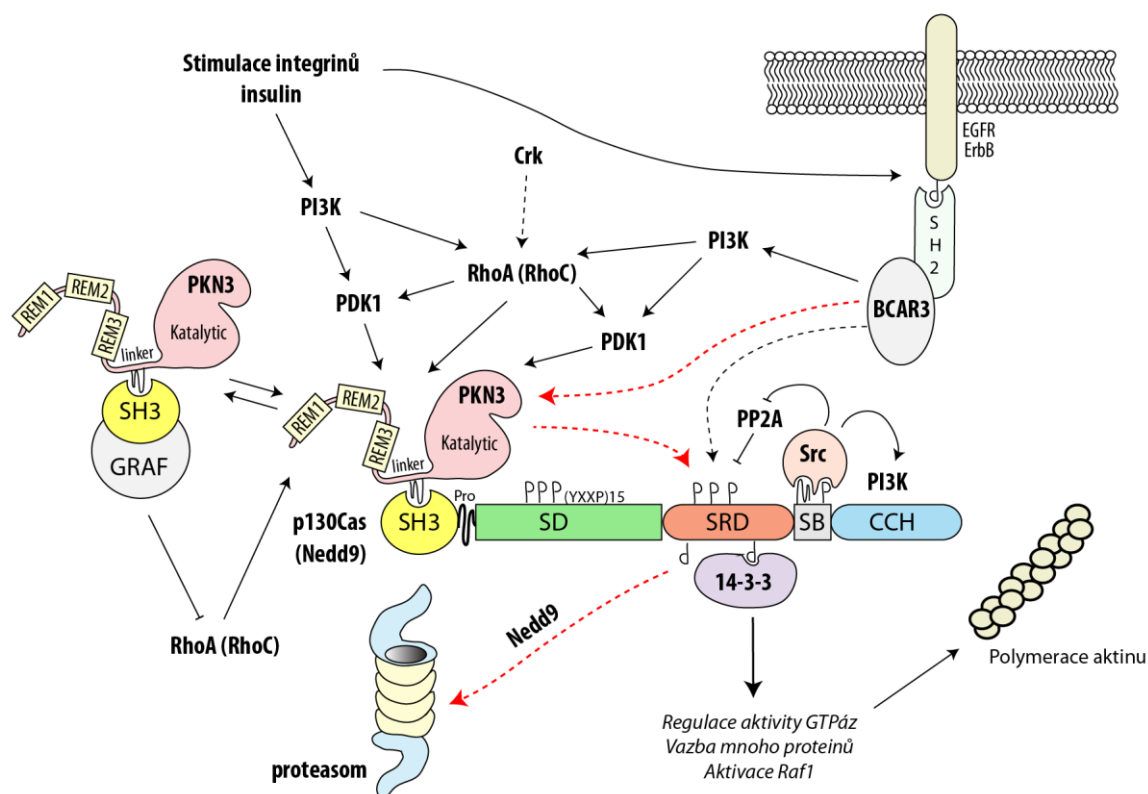
Kináza PKN3 byla pozorována v cytoplazmě, především v perinukleární oblasti a její aktivní forma je specificky nabohacena v jádře (Oishi et al., 1999; Unsal-Kacmaz et al., 2011). Kromě těchto lokalizací jsme pozorovali PKN3 i v oblasti lamelipodií buněk HELA. Jak v jádře a perinukleárních oblastech, tak v lamelipodiích jsme detekovali kolokalizaci PKN3 s p130Cas. Nicméně jak bylo zmíněno výše, protilátka anti-PKN3 na blotech rozpoznávala silně 2 bandy, z nichž pouze horní odpovídá molekulové hmotnosti PKN3. Funkce PKN3 v jádře není dosud známa, ale aktivní PKN3 zde kolokalizuje s GTPázami RhoA a RhoC (Unsal-Kacmaz et al., 2011). Se zvýšenou buněčnou expresí PKN3, BCAR3 a p130Cas také koreluje nabohacená jaderná lokalizace p130Cas a i jeho zvýšená serinová fosforylace (viz kapitola 2.1.3, str. 22; Makkinje et al., 2009; Near et al., 2007; Schrecengost et al., 2007; Unsal-Kacmaz et al., 2011). Schrecengost se svojí skupinou navíc pozoroval úbytek p130Cas v jádře po cíleném snížení exprese BCAR3 pomocí siRNA (Schrecengost et al., 2007). Námi provedené vazebné analýzy probíhaly z lyzátů připravených v lyzačním pufru s 0,5 % Nonidetem, který nemá dostatečnou sílu k rozrušení jaderné membrány. Z toho plyne, že jsme pozorovali pouze cytoplazmatickou interakci p130Cas s PKN3. K těmto interakcím

dochází pravděpodobně i v jádře ([viz Obr. 5.12, str. 103](#)), kam se přemísťuje aktivní forma PKN3 (Unsal-Kacmaz et al., 2011).

PKN3 je aktivována přímou interakcí svými N-koncovými regulačními doménami s Rho GTPázami (RhoA, Rhob, RhoC), z nichž preferenčně váže RhoC, jejíž nadprodukce je typická v pozdějších fázích rakoviny prsu a prostaty (Unsal-Kacmaz et al., 2011). Protein p130Cas s těmito GTPázami oboustranně komunikuje ([viz kapitola 2.1.2, str. 17](#)). Nejlépe lze tuto signalizaci a potenciální propojení s PKN3 naznačit přes protein Crk (*respektive přes jeho odvozenou virovou variantu v-Crk*; [viz Obr. 6.1](#)). Transformace buněk onkogenem *v-crk* stimuluje vazbu PI3K s proteinem p130Cas a vede k aktivaci RhoA (Altun-Gultekin et al., 1998; Riggins et al., 2003a; Tsuda et al., 2002). Onkoprotein v-Crk také stimuluje nejen tyrosinovou, ale i serinovou fosforylaci p130Cas podporující jeho jadernou lokalizaci. Imunoprecipitace s in vitro kinázovou analýzou navíc ukázaly, že v-Crk asociuje se Ser/Thr kinázami (Mayer and Hanafusa, 1990; Sakai et al., 1994).

Propojení signalizace p130Cas a PKN3 s malými GTPázami lze také ukázat na základě známé interakce PKN3 s proteiny GRAF1 a GRAF2, které stimulují GTPázovou aktivitu RhoA a Cdc42, a tak pravděpodobně inhibují aktivitu PKN3 (Leenders et al., 2004; Ohba et al., 1998; Shibata et al., 2001; [viz Obr. 6.1](#)). Proteiny GRAF totiž také propojují kinázu FAK či PYK2, vázající a fosforylující p130Cas, s regulací GTPáz Rho během integrinové signalizace (Hildebrand et al., 1996; Ohba et al., 1998). Zajímavé je, že se proteiny GRAF1 a GRAF2 váží k těmto kinázám (FAK, PYK2) přes dvě stejné polyprolinové sekvence jako p130Cas, ačkoli mají na rozdíl od p130Cas vyšší preferenci pro druhou polyprolinovou sekvenci kinázy PYK2 (Hildebrand et al., 1996; Ohba et al., 1998). Proteiny GRAF rovněž pravděpodobně sdílí vazebné místo na PKN3 s proteinem p130Cas (Shibata et al., 2001; [viz Obr. 6.1](#)).

Kináza PKN3 by mohla protein p130Cas fosforylovat nejen v interfázi závisle na buněčné adhezi, ale i v mitóze, neboť je aktivní v průběhu celého buněčného cyklu (Daub et al., 2008; Dephoure et al., 2008). Tato fosforylace by pak eventuálně mohla mít vliv na rozpad fokálních adhezí ([viz kapitola 2.1.4, str. 25](#)). V případě, že se neprokáže serinová fosforylace p130Cas katalyzovaná kinázou PKN3, protein p130Cas by přesto mohl sloužit jako zprostředkovatel interakce mezi svými interakčními partnery a kinázou PKN3.



Obr. 6.1: Navržené schéma serinové fosforylace p130Cas. Stimulace integrinů či buněk insulinem vede k aktivaci kinázy PI3K, která podporuje aktivaci GTPáz rodiny Rho či kinázy PDK1. Proteiny Rho se váží k doménám REM proteinu PKN3, což vede k jeho aktivaci. Zároveň umožňují interakci PDK1 s PKN3, jenž aktivitu PKN3 dále zvyšuje. Naopak proteiny GRAF, které by mohly kompetovat o vazbu PKN3 s p130Cas, stimuluji inaktivaci GTPáz Rho. Alternativní dráhu představuje protein Crk či BCAR3 (*dráhy propojeny černými přerušovanými šipkami nejsou dosud uspokojivě vysvětleny*). Aktivace integrinových receptorů vede k fosforylaci receptorů EGFR a ErbB, což umožňuje vazbu BCAR3. Exprese proteinu BCAR3, stejně jako Crk vede k serinové fosforylaci p130Cas a pravděpodobně k aktivaci PKN3 přes PI3K či Rho GTPázy. Fosforylace p130Cas na serinech umožňuje vazbu adaptorovým proteinům rodiny 14-3-3, které následně umožňují vazbu mnoha proteinům a aktivují např. kinázu Raf1. PKN3 by také mohl fosforylovat Nedd9 a ovlivňovat tak jeho degradaci proteasomem. Červené přerušované šipky představují dosud nepotvrzené procesy.

Interakce druhého vybraného kandidátního proteinu CEP2 s SH3 doménou p130Cas se neprokázala, překvapivě však ve vazebných experimentech interagoval s SH3 doménou kinázy Src. Protein CEP2 (Cdc42 effector protein 2; Borg1) patří do rodiny efektorových proteinů prvně identifikovaných přímou interakcí s aktivovanou Cdc42. Ektopická exprese CEP2 ve fibroblastech indukuje dlouhé, úzké filopodia (pseudopodia) (Hirsch et al., 2001). Kináza Src také ovlivňuje tvorbu filopodií, a to fosforylací proteinů dráhy Paxillin-PKL- β -PIX, jejichž fosforylace vede k aktivaci GTPázy Cdc42 (shrnutí v Huveneers and Danen, 2009). V sekvenci proteinu CEP2 lze nalézt jedno polyprolinové místo (PDGPSPLL) potenciálně vhodné pro vazbu SH3 domény Src. Tyto informace naznačují, že by kináza Src mohla ovlivňovat tvorbu filopodií částečně přes protein CEP2.

Nicméně kapacita naší laboratoře neumožňuje další charakterizaci této potenciální interakce.

Do budoucna chceme potvrdit přímou interakci p130Cas-PKN3 in vitro pomocí vazby purifikovaných proteinů PKN3 a p130Cas, abychom vyvrátili možnost nepřímé interakce přes proteiny PKN3-GRAFs-FAK-p130Cas. Dále se chceme věnovat charakterizaci významu této nově popsané interakce PKN3-p130Cas. Protein p130Cas je nezbytný pro invazivitu a tvorbu metastáz v buňkách transformovaných aktivovanou kinázou Src (Brabek et al., 2004). V naší laboratoři bylo dříve ukázáno, že zabránění fosforylace Tyr12 na vazebném povrchu SH3 domény snižuje invazivitu těchto buněk na úroveň buněk neexprimujících p130Cas (Janostiak et al, 2011). Z tohoto důvodu chceme sledovat vliv snížení exprese (pomocí shRNA) a nadprodukce PKN3 na invazivitu a migraci *p130cas*^{-/-} buněk transformovaných aktivovanou kinázou Src reexprimujících p130Cas. Tyto experimenty plánujeme zopakovat i na buněčných liniích rakoviny prsu (MDA-231MB), u kterých je prokázána vysoká exprese PKN3 vedoucí k zvýšenému růstu těchto buněk na 3D matrici (Unsal-Kacmaz et al., 2011).

7. Závěr

- Jako první jsme popsali, ověřili a charakterizovali vazebný motiv SH3 domény p130Cas. U tohoto motivu [AP]-P-[APMS]-K-P-[LPST]-[LR]-[LPST] jsme pak následně ukázali, že může být úspěšně používán pro předpovězení sekvence potenciálních interaktorů zodpovědné za vazbu SH3 domény p130Cas.
- Ukázali jsme, že kotvící aminokyselinu ligandu SH3 domény p130Cas může představovat i hydrofobní leucin. Tato aminokyselina pravděpodobně nesnižuje afinitu polypeptidu oproti peptidům s kotvícím argininem.
- Změřili jsme EC50 (efektivní koncentraci) nejlépe se vázající sekvence k SH3 doméně p130Cas (FHAPPSKPPLPK) jako 365 ± 98 nM. Tuto afinitu v porovnání s hodnotami jiných SH3 domén lze označit za velmi silnou.
- Vytvořili jsme model SH3 domény p130Cas s peptidem PPPKPPR (odvozeným od vazebné sekvence PTP-PEST). Tento model nám umožnil naznačit negativní vliv mutace Tyr12 p130Cas za fosfomimikující glutamát na vazbu ligandu a interakce kotvících aminokyselin (arginin či leucin) polypeptidu s aminokyselinami nacházejícími se ve třetím vazebném žlábků SH3 p130Cas.
- Ukázali jsme, že mutace Tyr90 v SH3 doméně Src a Tyr12 u p130Cas za nefosforylovatelný fenylalanin způsobuje pokles vazby asi 2 krát. To lze pravděpodobně vysvětlit ztrátou vodíkového můstku mezi OH (hydroxy) skupinou tyrosinu a prolinem ligandu, který je pro vazbu SH3 domén esenciální.
- Ukázali jsme, že mutace Tyr90 SH3 domény Src a Tyr12 p130Cas za fosfomimikující glutamát způsobuje pokles vazby o 3 řády k ligandům I. i II. třídy.
- Předpověděli jsme a následně ověřili interakci proteinu PKN3 s p130Cas. Tyto proteiny kolokalizují v perinukleárních oblastech a v jádře.
- Rešeršní a bioinformatická analýza naznačuje, že by PKN3 mohla fosforylovat p130Cas v doméně bohaté na seriny, a to na serinech Ser569, Ser494, Ser428.

8. Seznam použité literatury

- Abassi, Y.A., M. Rehn, N. Ekman, K. Alitalo, and K. Vuori. 2003. p130Cas Couples the tyrosine kinase Bmx/Etk with regulation of the actin cytoskeleton and cell migration. *J Biol Chem.* 278:35636-35643.
- Adams, J.R., N.F. Schachter, J.C. Liu, E. Zacksenhaus, and S.E. Egan. 2011. Elevated PI3K signaling drives multiple breast cancer subtypes. *Oncotarget.* 2:435-447.
- Agrawal, V., and K.V.R. Kishan. 2002. Promiscuous binding nature of SH3 domains to their target proteins. *Protein and Peptide Letters.* 9:185-193.
- Almeida, E.A., D. Ilic, Q. Han, C.R. Hauck, F. Jin, H. Kawakatsu, D.D. Schlaepfer, and C.H. Damsky. 2000. Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Cell Biol.* 149:741-754.
- Altun-Gultekin, Z.F., S. Chandriani, C. Bougeret, T. Ishizaki, S. Narumiya, P. de Graaf, P. Van Bergen en Henegouwen, H. Hanafusa, J.A. Wagner, and R.B. Birge. 1998. Activation of Rho-dependent cell spreading and focal adhesion biogenesis by the v-Crk adaptor protein. *Mol Cell Biol.* 18:3044-3058.
- Ambrogio, C., C. Voena, A.D. Manazza, R. Piva, L. Riera, L. Barberis, C. Costa, G. Tarone, P. Defilippi, E. Hirsch, E. Boeri Erba, S. Mohammed, O.N. Jensen, G. Palestro, G. Inghirami, and R. Chiarle. 2005. p130Cas mediates the transforming properties of the anaplastic lymphoma kinase. *Blood.* 106:3907-3916.
- Armulik, A., T. Velling, and S. Johansson. 2004. The integrin beta1 subunit transmembrane domain regulates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate. *Mol Biol Cell.* 15:2558-2567.
- Bargon, S.D., P.W. Gunning, and G.M. O'Neill. 2005. The Cas family docking protein, HEF1, promotes the formation of neurite-like membrane extensions. *Biochim Biophys Acta.* 1746:143-154.
- Bazzoni, G., N. Carlesso, J.D. Griffin, and M.E. Hemler. 1996. Bcr/Abl expression stimulates integrin function in hematopoietic cell lines. *J Clin Invest.* 98:521-528.
- Bianchi, M., S. De Lucchini, O. Marin, D.L. Turner, S.K. Hanks, and E. Villa-Moruzzi. 2005. Regulation of FAK Ser-722 phosphorylation and kinase activity by GSK3 and PP1 during cell spreading and migration. *Biochem J.* 391:359-370.
- Bouton, A.H., R.B. Riggins, and P.J. Bruce-Staskal. 2001. Functions of the adapter protein Cas: signal convergence and the determination of cellular responses. *Oncogene.* 20:6448-6458.
- Brabek, J., S.S. Constancio, N.Y. Shin, A. Pozzi, A.M. Weaver, and S.K. Hanks. 2004. CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells. *Oncogene.* 23:7406-7415.
- Brabek, J., S.S. Constancio, P.F. Siesser, N.Y. Shin, A. Pozzi, and S.K. Hanks. 2005. Crk-associated substrate tyrosine phosphorylation sites are critical for invasion and metastasis of Src-transformed cells. *Molecular Cancer Research.* 3:307-315.
- Briknarova, K., F. Nasertorabi, M.L. Havert, E. Eggleston, D.W. Hoyt, C. Li, A.J. Olson, K. Vuori, and K.R. Ely. 2005. The serine-rich domain from Crk-associated substrate (p130cas) is a four-helix bundle. *J Biol Chem.* 280:21908-21914.
- Brinkman, A., D. de Jong, S. Tuinman, N. Azaouagh, T. van Agthoven, and L.C. Dorssers. 2010. The substrate domain of BCAR1 is essential for anti-estrogen-resistant proliferation of human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment.* 120:401-408.
- Brinkman, A., S. van der Flier, E.M. Kok, and L.C. Dorssers. 2000. BCAR1, a human homologue of the adapter protein p130Cas, and antiestrogen resistance in breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 92:112-120.

- Bruck, S., T.B. Huber, R.J. Ingham, K. Kim, H. Niederstrasser, P.M. Allen, T. Pawson, J.A. Cooper, and A.S. Shaw. 2006. Identification of a novel inhibitory actin-capping protein binding motif in CD2-associated protein. *J Biol Chem.* 281:19196-19203.
- Burnham, M.R., M.T. Harte, A. Richardson, J.T. Parsons, and A.H. Bouton. 1996. The identification of p130cas-binding proteins and their role in cellular transformation. *Oncogene.* 12:2467-2472.
- Cabodi, S., M. del Pilar Camacho-Leal, P. Di Stefano, and P. Defilippi. 2010a. Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story. *Nat Rev Cancer.* 10:858-870.
- Cabodi, S., L. Moro, G. Baj, M. Smeriglio, P. Di Stefano, S. Gippone, N. Surico, L. Silengo, E. Turco, G. Tarone, and P. Defilippi. 2004. p130Cas interacts with estrogen receptor alpha and modulates non-genomic estrogen signaling in breast cancer cells. *J Cell Sci.* 117:1603-1611.
- Cabodi, S., A. Tinnirello, B. Bisaro, G. Tornillo, M. del Pilar Camacho-Leal, G. Forni, R. Cojoca, M. Iezzi, A. Amici, M. Montani, A. Eva, P. Di Stefano, S.K. Muthuswamy, G. Tarone, E. Turco, and P. Defilippi. 2010b. p130Cas is an essential transducer element in ErbB2 transformation. *FASEB J.* 24:3796-3808.
- Cai, D., L.K. Clayton, A. Smolyar, and A. Lerner. 1999. AND-34, a novel p130Cas-binding thymic stromal cell protein regulated by adhesion and inflammatory cytokines. *J Immunol.* 163:2104-2112.
- Cai, D., K.N. Felekis, R.I. Near, G.M. O'Neill, J.M. van Seventer, E.A. Golemis, and A. Lerner. 2003a. The GDP exchange factor AND-34 is expressed in B cells, associates with HEF1, and activates Cdc42. *J Immunol.* 170:969-978.
- Cai, D., A. Iyer, K.N. Felekis, R.I. Near, Z. Luo, J. Chernoff, C. Albanese, R.G. Pestell, and A. Lerner. 2003b. AND-34/BCAR3, a GDP exchange factor whose overexpression confers antiestrogen resistance, activates Rac, PAK1, and the cyclin D1 promoter. *Cancer Res.* 63:6802-6808.
- Carducci, M., L. Perfetto, L. Briganti, S. Paoluzi, S. Costa, J. Zerweck, M. Schutkowski, L. Castagnoli, and G. Cesareni. 2012. The protein interaction network mediated by human SH3 domains. *Biotechnology advances.* 30:4-15.
- Cary, L.A., D.C. Han, T.R. Polte, S.K. Hanks, and J.L. Guan. 1998. Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Cell Biol.* 140:211-221.
- Casanova, I., M. Parreno, L. Farre, S. Guerrero, M.V. Cespedes, M.A. Pavon, F.J. Sancho, E. Marcuello, M. Trias, and R. Manges. 2006. Celecoxib induces anoikis in human colon carcinoma cells associated with the deregulation of focal adhesions and nuclear translocation of p130Cas. *Int J Cancer.* 118:2381-2389.
- Collazos, A., N. Michael, R.D. Whelan, G. Kelly, H. Mellor, L.C. Pang, N. Totty, and P.J. Parker. 2011. Site recognition and substrate screens for PKN family proteins. *Biochem J.* 438:535-543.
- Cowell, L.N., J.D. Graham, A.H. Bouton, C.L. Clarke, and G.M. O'Neill. 2006. Tamoxifen treatment promotes phosphorylation of the adhesion molecules, p130Cas/BCAR1, FAK and Src, via an adhesion-dependent pathway. *Oncogene.* 25:7597-7607.
- Dadke, S., and J. Chernoff. 2002. Interaction of protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B with its substrates is influenced by two distinct binding domains. *Biochem J.* 364:377-383.
- Dail, M., M.S. Kalo, J.A. Seddon, J.F. Cote, K. Vuori, and E.B. Pasquale. 2004. SHEP1 function in cell migration is impaired by a single amino acid mutation that disrupts association with the scaffolding protein cas but not with Ras GTPases. *J Biol*

- Chem.* 279:41892-41902.
- Daub, H., J.V. Olsen, M. Bairlein, F. Gnad, F.S. Oppermann, R. Korner, Z. Greff, G. Keri, O. Stemmann, and M. Mann. 2008. Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Mol Cell.* 31:438-448.
- Deakin, N.O., M.D. Bass, S. Warwood, J. Schoelermann, Z. Mostafavi-Pour, D. Knight, C. Ballestrem, and M.J. Humphries. 2009. An integrin- α 4-14-3-3 ζ -paxillin ternary complex mediates localised Cdc42 activity and accelerates cell migration. *J Cell Sci.* 122:1654-1664.
- DeClerck, Y.A. 2000. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur J Cancer.* 36:1258-1268.
- Defilippi, P., P. Di Stefano, and S. Cabodi. 2006. p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks. *Trends Cell Biol.* 16:257-263.
- DeLano, W.L. 2002. The PyMOL Molecular Graphics System. *DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.*
- Deng, B., W. Huang, Q.Y. Tan, X.Q. Fan, Y.G. Jiang, L. Liu, Y.Y. Zhong, Y.G. Liang, and R.W. Wang. 2011. Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1 (BCAR1/p130cas) in pulmonary disease tissue and serum. *Mol Diagn Ther.* 15:31-40.
- Dephoure, N., C. Zhou, J. Villen, S.A. Beausoleil, C.E. Bakalarski, S.J. Elledge, and S.P. Gygi. 2008. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:10762-10767.
- Di Stefano, P., S. Cabodi, E. Boeri Erba, V. Margaria, E. Bergatto, M.G. Giuffrida, L. Silengo, G. Tarone, E. Turco, and P. Defilippi. 2004. P130Cas-associated protein (p140Cap) as a new tyrosine-phosphorylated protein involved in cell spreading. *Mol Biol Cell.* 15:787-800.
- Dodelet, V.C., C. Pazzagli, A.H. Zisch, C.A. Hauser, and E.B. Pasquale. 1999. A novel signaling intermediate, SHEP1, directly couples Eph receptors to R-Ras and Rap1A. *J Biol Chem.* 274:31941-31946.
- Dolfi, F., M. Garcia-Guzman, M. Ojaniemi, H. Nakamura, M. Matsuda, and K. Vuori. 1998. The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:15394-15399.
- Donaldson, J.C., P.J. Dempsey, S. Reddy, A.H. Bouton, R.J. Coffey, and S.K. Hanks. 2000. Crk-associated substrate p130(Cas) interacts with nephrocystin both proteins localize to cell-cell contacts of polarized epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 256:168-178.
- Donato, D.M., L.M. Ryzhova, L.M. Meenderink, I. Kaverina, and S.K. Hanks. 2010. Dynamics and mechanism of p130Cas localization to focal adhesions. *J Biol Chem.* 285:20769-20779.
- Dong, L.Q., L.R. Landa, M.J. Wick, L. Zhu, H. Mukai, Y. Ono, and F. Liu. 2000. Phosphorylation of protein kinase N by phosphoinositide-dependent protein kinase-1 mediates insulin signals to the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:5089-5094.
- Felekakis, K.N., R.P. Narsimhan, R. Near, A.F. Castro, Y. Zheng, L.A. Quilliam, and A. Lerner. 2005. AND-34 activates phosphatidylinositol 3-kinase and induces anti-estrogen resistance in a SH2 and GDP exchange factor-like domain-dependent manner. *Mol Cancer Res.* 3:32-41.
- Feller, S.M., B. Knudsen, and H. Hanafusa. 1994. c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk. *EMBO J.* 13:2341-2351.

- Flinn, H.M., and A.J. Ridley. 1996. Rho stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, p130 and paxillin. *J Cell Sci.* 109 (Pt 5):1133-1141.
- Flint, A.J., T. Tiganis, D. Barford, and N.K. Tonks. 1997. Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:1680-1685.
- Fonseca, P.M., N.Y. Shin, J. Brabek, L. Ryzhova, J. Wu, and S.K. Hanks. 2004. Regulation and localization of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation. *Cell Signal.* 16:621-629.
- Frasor, J., E.C. Chang, B. Komm, C.Y. Lin, V.B. Vega, E.T. Liu, L.D. Miller, J. Smeds, J. Bergh, and B.S. Katzenellenbogen. 2006. Gene expression preferentially regulated by tamoxifen in breast cancer cells and correlations with clinical outcome. *Cancer Res.* 66:7334-7340.
- Funasaka, K., S. Ito, H. Hasegawa, G.S. Goldberg, Y. Hirooka, H. Goto, M. Hamaguchi, and T. Senga. 2010. Cas utilizes Nck2 to activate Cdc42 and regulate cell polarization during cell migration in response to wound healing. *FEBS J.* 277:3502-3513.
- Garcia-Guzman, M., F. Dolfi, M. Russello, and K. Vuori. 1999. Cell adhesion regulates the interaction between the docking protein p130(Cas) and the 14-3-3 proteins. *J Biol Chem.* 274:5762-5768.
- Garton, A.J., M.R. Burnham, A.H. Bouton, and N.K. Tonks. 1997. Association of PTP-PEST with the SH3 domain of p130(cas); A novel mechanism of protein tyrosine phosphatase substrate recognition. *Oncogene.* 15:877-885.
- Garton, A.J., A.J. Flint, and N.K. Tonks. 1996. Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *Mol Cell Biol.* 16:6408-6418.
- Garton, A.J., and N.K. Tonks. 1999. Regulation of fibroblast motility by the protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *J Biol Chem.* 274:3811-3818.
- Gingras, D., M. Michaud, G. Di Tomasso, E. Beliveau, C. Nyalendo, and R. Beliveau. 2008. Sphingosine-1-phosphate induces the association of membrane-type 1 matrix metalloproteinase with p130Cas in endothelial cells. *FEBS Lett.* 582:399-404.
- Girardin, S.E., and M. Yaniv. 2001. A direct interaction between JNK1 and CrkII is critical for Rac1-induced JNK activation. *EMBO J.* 20:3437-3446.
- Gotoh, T., D. Cai, X. Tian, L.A. Feig, and A. Lerner. 2000. p130Cas regulates the activity of AND-34, a novel Ral, Rap1, and R-Ras guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem.* 275:30118-30123.
- Gotoh, T., S. Hattori, S. Nakamura, H. Kitayama, M. Noda, Y. Takai, K. Kaibuchi, H. Matsui, O. Hatase, H. Takahashi, and et al. 1995. Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor C3G. *Mol Cell Biol.* 15:6746-6753.
- Grabs, D., V.I. Slepnev, Z. Songyang, C. David, M. Lynch, L.C. Cantley, and P. De Camilli. 1997. The SH3 domain of amphiphysin binds the proline-rich domain of dynamin at a single site that defines a new SH3 binding consensus sequence. *J Biol Chem.* 272:13419-13425.
- Guilluy, C., R. Garcia-Mata, and K. Burridge. 2011. Rho protein crosstalk: another social network? *Trends Cell Biol.* 21:718-726.
- Hakak, Y., and G.S. Martin. 1999. Cas mediates transcriptional activation of the serum response element by Src. *Mol Cell Biol.* 19:6953-6962.
- Hall, A. 2009. The cytoskeleton and cancer. *Cancer metastasis reviews.* 28:5-14.
- Harte, M.T. 1996. P130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. s.

- Harte, M.T., M. Macklem, C.L. Weidow, J.T. Parsons, and A.H. Bouton. 2000. Identification of two focal adhesion targeting sequences in the adapter molecule p130(Cas). *Biochim Biophys Acta*. 1499:34-48.
- Hattori, M., and N. Minato. 2003. Rap1 GTPase: functions, regulation, and malignancy. *J Biochem*. 134:479-484.
- Hawkins, P.T., A. Eguinoa, R.G. Qiu, D. Stokoe, F.T. Cooke, R. Walters, S. Wennstrom, L. Claesson-Welsh, T. Evans, M. Symons, and et al. 1995. PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol*. 5:393-403.
- Hildebrand, J.D., J.M. Taylor, and J.T. Parsons. 1996. An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol*. 16:3169-3178.
- Hildebrandt, F., E. Otto, C. Rensing, H.G. Nothwang, M. Vollmer, J. Adolphs, H. Hanusch, and M. Brandis. 1997. A novel gene encoding an SH3 domain protein is mutated in nephronophthisis type 1. *Nat Genet*. 17:149-153.
- Hirsch, D.S., D.M. Pirone, and P.D. Burbelo. 2001. A new family of Cdc42 effector proteins, CEPs, function in fibroblast and epithelial cell shape changes. *J Biol Chem*. 276:875-883.
- Hivert, V., J. Pierre, and J. Raingeaud. 2009. Phosphorylation of human enhancer of filamentation (HEF1) on serine 369 induces its proteasomal degradation. *Biochem Pharmacol*. 78:1017-1025.
- Holt, M.R., and A. Koffer. 2001. Cell motility: proline-rich proteins promote protrusions. *Trends Cell Biol*. 11:38-46.
- Honda, H., T. Nakamoto, R. Sakai, and H. Hirai. 1999. p130(Cas), an assembling molecule of actin filaments, promotes cell movement, cell migration, and cell spreading in fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 262:25-30.
- Honda, H., H. Oda, T. Nakamoto, Z. Honda, R. Sakai, T. Suzuki, T. Saito, K. Nakamura, K. Nakao, T. Ishikawa, M. Katsuki, Y. Yazaki, and H. Hirai. 1998. Cardiovascular anomaly, impaired actin bundling and resistance to Src-induced transformation in mice lacking p130Cas. *Nat Genet*. 19:361-365.
- Hoon Kim, D., S. Jeon Choi, S. Kook, W. Kim, and W. Keun Song. 2003. Phosphorylation-dependent cleavage of p130cas in apoptotic rat-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 300:141-148.
- Hsia, D.A., S.K. Mitra, C.R. Hauck, D.N. Streblow, J.A. Nelson, D. Ilic, S. Huang, E. Li, G.R. Nemerow, J. Leng, K.S. Spencer, D.A. Cheresch, and D.D. Schlaepfer. 2003. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol*. 160:753-767.
- Huveneers, S., and E.H. Danen. 2009. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci*. 122:1059-1069.
- Chen, J., B.L. Martin, and D.L. Brautigan. 1992. Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science*. 257:1261-1264.
- Chen, J., S. Parsons, and D.L. Brautigan. 1994. Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts. *J Biol Chem*. 269:7957-7962.
- Cho, S.Y., and R.L. Klemke. 2000. Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix. *J Cell Biol*. 149:223-236.
- Chodniewicz, D., and R.L. Klemke. 2004. Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold. *Biochim Biophys Acta*. 1692:63-76.

- Christensen, G.L., C.D. Kelstrup, C. Lyngso, U. Sarwar, R. Bogebo, S.P. Sheikh, S. Gammeltoft, J.V. Olsen, and J.L. Hansen. 2010. Quantitative phosphoproteomics dissection of seven-transmembrane receptor signaling using full and biased agonists. *Mol Cell Proteomics*. 9:1540-1553.
- Janostiak, R., O. Tolde, Z. Bruhova, M. Novotny, S.K. Hanks, D. Rosel, and J. Brabek. 2011. Tyrosine Phosphorylation within the SH3 domain Regulates CAS Subcellular Localization, Cell Migration, and Invasiveness. *Mol Biol Cell*.
- Janoštiak, R. 2010. Biologický význam tyrosinové fosforylace v SH3 doméně proteinu CAS. *PřF UK v Praze*. Diplomová práce.
- Janssen, H., and P. Marynen. 2006. Interaction partners for human ZNF384/CIZ/NMP4--zyxin as a mediator for p130CAS signaling? *Exp Cell Res*. 312:1194-1204.
- Jones, R.B., A. Gordus, J.A. Krall, and G. MacBeath. 2006. A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature*. 439:168-174.
- Jucker, M., K. McKenna, A.J. da Silva, C.E. Rudd, and R.A. Feldman. 1997. The Fes protein-tyrosine kinase phosphorylates a subset of macrophage proteins that are involved in cell adhesion and cell-cell signaling. *J Biol Chem*. 272:2104-2109.
- Kang, Y.S., W. Kim, Y.H. Huh, J. Bae, J.S. Kim, and W.K. Song. 2011. P130Cas attenuates epidermal growth factor (EGF) receptor internalization by modulating EGF-triggered dynamin phosphorylation. *PLoS One*. 6:e20125.
- Kanner, S.B., A.B. Reynolds, H.C. Wang, R.R. Vines, and J.T. Parsons. 1991. The SH2 and SH3 domains of pp60src direct stable association with tyrosine phosphorylated proteins p130 and p110. *EMBO J*. 10:1689-1698.
- Karkkainen, S., M. Hiipakka, J.H. Wang, I. Kleino, M. Vaha-Jaakkola, G.H. Renkema, M. Liss, R. Wagner, and K. Saksela. 2006. Identification of preferred protein interactions by phage-display of the human Src homology-3 proteome. *EMBO Rep*. 7:186-191.
- Kim, J.Y., K. Huh, R. Jung, and T.J. Kim. 2011. Identification of BCAR-1 as a new substrate of Syk tyrosine kinase through a determination of amino acid sequence preferences surrounding the substrate tyrosine residue. *Immunol Lett*. 135:151-157.
- Kim, W., S. Kook, D.J. Kim, C. Teodorof, and W.K. Song. 2004. The 31-kDa caspase-generated cleavage product of p130cas functions as a transcriptional repressor of E2A in apoptotic cells. *J Biol Chem*. 279:8333-8342.
- Kim, W., Y. Seok Kang, J. Soo Kim, N.Y. Shin, S.K. Hanks, and W.K. Song. 2008. The integrin-coupled signaling adaptor p130Cas suppresses Smad3 function in transforming growth factor-beta signaling. *Mol Biol Cell*. 19:2135-2146.
- Kirsch, K.H., M.M. Georgescu, and H. Hanafusa. 1998. Direct binding of p130(Cas) to the guanine nucleotide exchange factor C3G. *J. Biol. Chem*. 273:25673-25679.
- Kirsch, K.H., M.M. Georgescu, S. Ishimaru, and H. Hanafusa. 1999. CMS: an adapter molecule involved in cytoskeletal rearrangements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:6211-6216.
- Kiyokawa, E., Y. Hashimoto, S. Kobayashi, H. Sugimura, T. Kurata, and M. Matsuda. 1998. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev*. 12:3331-3336.
- Klemke, R.L., J. Leng, R. Molander, P.C. Brooks, K. Vuori, and D.A. Cheresh. 1998. CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J Cell Biol*. 140:961-972.
- Klinghoffer, R.A., C. Sachsenmaier, J.A. Cooper, and P. Soriano. 1999. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J*. 18:2459-2471.

- Konrad, R.J., G. Gold, T.N. Lee, R. Workman, C.L. Broderick, and M.D. Knierman. 2003. Glucose stimulates the tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 278:28116-28122.
- Kumagai, N., N. Morii, K. Fujisawa, Y. Nemoto, and S. Narumiya. 1993. ADP-ribosylation of rho p21 inhibits lysophosphatidic acid-induced protein tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activation in cultured Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem.* 268:24535-24538.
- Lachmann, S., A. Jevons, M. De Rycker, A. Casamassima, S. Radtke, A. Collazos, and P.J. Parker. 2011. Regulatory Domain Selectivity in the Cell-Type Specific PKN-Dependence of Cell Migration. *PLoS One.* 6.
- Law, S.F., Y.Z. Zhang, S.J. Fashena, G. Toby, J. Estojak, and E.A. Golemis. 1999. Dimerization of the docking/adaptor protein HEF1 via a carboxy-terminal helix-loop-helix domain. *Exp Cell Res.* 252:224-235.
- Law, S.F., Y.Z. Zhang, A.J. Klein-Szanto, and E.A. Golemis. 1998. Cell cycle-regulated processing of HEF1 to multiple protein forms differentially targeted to multiple subcellular compartments. *Mol Cell Biol.* 18:3540-3551.
- Leenders, F., K. Mopert, A. Schmiedeknecht, A. Santel, F. Czauderna, M. Aleku, S. Penschuck, S. Dames, M. Sternberger, T. Rohl, A. Wellmann, W. Arnold, K. Giese, J. Kaufmann, and A. Klippel. 2004. PKN3 is required for malignant prostate cell growth downstream of activated PI 3-kinase. *EMBO J.* 23:3303-3313.
- Lehtonen, S., F. Zhao, and E. Lehtonen. 2002. CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283:F734-743.
- Li, E., D.G. Stupack, S.L. Brown, R. Klemke, D.D. Schlaepfer, and G.R. Nemerow. 2000. Association of p130CAS with phosphatidylinositol-3-OH kinase mediates adenovirus cell entry. *J Biol Chem.* 275:14729-14735.
- Li, S.S. 2005. Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J.* 390:641-653.
- Li, X., and H.S. Earp. 1997. Paxillin is tyrosine-phosphorylated by and preferentially associates with the calcium-dependent tyrosine kinase in rat liver epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 272:14341-14348.
- Liu, F. 1996. Direct binding of the proline-rich region of protein tyrosine phosphatase 1B to the Src homology 3 domain of p130(Cas). s.
- Liu, F., D.E. Hill, and J. Chernoff. 1996. Direct binding of the proline-rich region of protein tyrosine phosphatase 1B to the Src homology 3 domain of p130(Cas). *J Biol Chem.* 271:31290-31295.
- Liu, F., M.A. Sells, and J. Chernoff. 1998. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates integrin signaling. *Curr Biol.* 8:173-176.
- Liu, X., A.E. Elia, S.F. Law, E.A. Golemis, J. Farley, and T. Wang. 2000. A novel ability of Smad3 to regulate proteasomal degradation of a Cas family member HEF1. *EMBO J.* 19:6759-6769.
- Lu, Y., J. Brush, and T.A. Stewart. 1999. NSP1 defines a novel family of adaptor proteins linking integrin and tyrosine kinase receptors to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem.* 274:10047-10052.
- Luo, W., R.J. Slebos, S. Hill, M. Li, J. Brabek, R. Amanchy, R. Chaerkady, A. Pandey, A.J.L. Ham, and S. Hanks. 2008. Global impact of oncogenic Src on a phosphotyrosine proteome. *JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH.* 7:3447-3460.
- Lyskov, S., and J.J. Gray. 2008. The RosettaDock server for local protein-protein docking. *Nucleic Acids Res.* 36:W233-238.

- Ma, A., A. Richardson, E.M. Schaefer, and J.T. Parsons. 2001. Serine phosphorylation of focal adhesion kinase in interphase and mitosis: a possible role in modulating binding to p130(Cas). *Mol Biol Cell*. 12:1-12.
- Mace, P.D., Y. Wallez, M.K. Dobaczewska, J.J. Lee, H. Robinson, E.B. Pasquale, and S.J. Riedl. 2011. NSP-Cas protein structures reveal a promiscuous interaction module in cell signaling. *Nat Struct Mol Biol*. 18:1381-1387.
- Makkinje, A., R.I. Near, G. Infusini, P. Vanden Borre, A. Bloom, D. Cai, C.E. Costello, and A. Lerner. 2009. AND-34/BCAR3 regulates adhesion-dependent p130Cas serine phosphorylation and breast cancer cell growth pattern. *Cell Signal*. 21:1423-1435.
- Manie, S.N., A. Astier, N. Haghayeghi, T. Canty, B.J. Druker, H. Hirai, and A.S. Freedman. 1997. Regulation of integrin-mediated p130(Cas) tyrosine phosphorylation in human B cells. A role for p59(Fyn) and SHP2. *J Biol Chem*. 272:15636-15641.
- Martin-Garcia, J.M., J. Ruiz-Sanz, and I. Luque. 2012. Interfacial water molecules in SH3 interactions: a revised paradigm for polyproline recognition. *Biochem J*. 442:443-451.
- Matsuda, M., B.J. Mayer, Y. Fukui, and H. Hanafusa. 1990. Binding of transforming protein, P47gag-crk, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins. *Science*. 248:1537-1539.
- Mayer, B.J. 2001. SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci*. 114:1253-1263.
- Mayer, B.J., and H. Hanafusa. 1990. Association of the v-crk oncogene product with phosphotyrosine-containing proteins and protein kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:2638-2642.
- Mayer, B.J., H. Hirai, and R. Sakai. 1995. Evidence that SH2 domains promote processive phosphorylation by protein-tyrosine kinases. *Curr Biol*. 5:296-305.
- Meenderink, L.M., L.M. Ryzhova, D.M. Donato, D.F. Gochberg, I. Kaverina, and S.K. Hanks. 2010. P130Cas Src-binding and substrate domains have distinct roles in sustaining focal adhesion disassembly and promoting cell migration. *PLoS One*. 5:e13412.
- Modzelewska, K., L.P. Newman, R. Desai, and P.J. Keely. 2006. Ack1 mediates Cdc42-dependent cell migration and signaling to p130Cas. *J Biol Chem*. 281:37527-37535.
- Nakamoto, T., R. Sakai, H. Honda, S. Ogawa, H. Ueno, T. Suzuki, S. Aizawa, Y. Yazaki, and H. Hirai. 1997. Requirements for localization of p130cas to focal adhesions. *Mol Cell Biol*. 17:3884-3897.
- Nakamoto, T., R. Sakai, K. Ozawa, Y. Yazaki, and H. Hirai. 1996. Direct binding of C-terminal region of p130Cas to SH2 and SH3 domains of Src kinase. *J Biol Chem*. 271:8959-8965.
- Nakamoto, T., T. Yamagata, R. Sakai, S. Ogawa, H. Honda, H. Ueno, N. Hirano, Y. Yazaki, and H. Hirai. 2000. CIZ, a zinc finger protein that interacts with p130(cas) and activates the expression of matrix metalloproteinases. *Mol Cell Biol*. 20:1649-1658.
- Neal, C.L., J. Xu, P. Li, S. Mori, J. Yang, N.N. Neal, X. Zhou, S.L. Wyszomierski, and D. Yu. 2011. Overexpression of 14-3-3zeta in cancer cells activates PI3K via binding the p85 regulatory subunit. *Oncogene*.
- Near, R.I., R.S. Smith, P.A. Toselli, T.F. Freddo, A.B. Bloom, P. Vanden Borre, D.C. Seldin, and A. Lerner. 2009. Loss of AND-34/BCAR3 expression in mice results in rupture of the adult lens. *Mol Vis*. 15:685-699.
- Near, R.I., Y. Zhang, A. Makkinje, P. Vanden Borre, and A. Lerner. 2007. AND-

- 34/BCAR3 differs from other NSP homologs in induction of anti-estrogen resistance, cyclin D1 promoter activation and altered breast cancer cell morphology. *J Cell Physiol.* 212:655-665.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 81:53-62.
- Nourry, C., L. Maksumova, M. Pang, X. Liu, and T. Wang. 2004. Direct interaction between Smad3, APC10, CDH1 and HEF1 in proteasomal degradation of HEF1. *BMC Cell Biol.* 5:20.
- Ohba, T., M. Ishino, H. Aoto, and T. Sasaki. 1998. Interaction of two proline-rich sequences of cell adhesion kinase beta with SH3 domains of p130(Cas)-related proteins and a GTPase-activating protein, Graf. *Biochemical Journal.* 330:1249-1254.
- Oishi, K., H. Mukai, H. Shibata, M. Takahashi, and Y. Ona. 1999. Identification and characterization of PKNbeta, a novel isoform of protein kinase PKN: expression and arachidonic acid dependency are different from those of PKNalpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 261:808-814.
- Ojaniemi, M., and K. Vuori. 1997. Epidermal growth factor modulates tyrosine phosphorylation of p130Cas. Involvement of phosphatidylinositol 3'-kinase and actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 272:25993-25998.
- Oktaý, M., K.K. Wary, M. Dans, R.B. Birge, and F.G. Giancotti. 1999. Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle. *J Cell Biol.* 145:1461-1469.
- Patil, P.N. 1996. Pharmacologic quantitation. *Indian J Exp Biol.* 34:615-633.
- Peters, E.A., P.J. Schatz, S.S. Johnson, and W.J. Dower. 1994. Membrane insertion defects caused by positive charges in the early mature region of protein pIII of filamentous phage fd can be corrected by prlA suppressors. *J Bacteriol.* 176:4296-4305.
- Polte, T.R., and S.K. Hanks. 1995. Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:10678-10682.
- Polte, T.R., and S.K. Hanks. 1997. Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130(Cas)) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs. *J Biol Chem.* 272:5501-5509.
- Polte, T.R., Hanks, S.K. 1995. Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130(Cas). s.
- Posern, G., J. Zheng, B.S. Knudsen, C. Kardinal, K.B. Muller, J. Voss, T. Shishido, D. Cowburn, G. Cheng, B. Wang, G.D. Kruh, S.K. Burrell, C.A. Jacobson, D.M. Lenz, T.J. Zamborelli, K. Adermann, H. Hanafusa, and S.M. Feller. 1998. Development of highly selective SH3 binding peptides for Crk and CRKL which disrupt Crk-complexes with DOCK180, SoS and C3G. *Oncogene.* 16:1903-1912.
- Pozuelo Rubio, M., K.M. Geraghty, B.H. Wong, N.T. Wood, D.G. Campbell, N. Morrice, and C. Mackintosh. 2004. 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J.* 379:395-408.
- Praefcke, G.J., and H.T. McMahon. 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nature reviews. Molecular cell biology.* 5:133-147.
- Prasad, N., R.S. Topping, and S.J. Decker. 2001. SH2-containing inositol 5'-phosphatase

- SHIP2 associates with the p130(Cas) adapter protein and regulates cellular adhesion and spreading. *Mol Cell Biol.* 21:1416-1428.
- Pratt, S.J., H. Eppele, M. Ward, Y. Feng, V.M. Braga, and G.D. Longmore. 2005. The LIM protein Ajuba influences p130Cas localization and Rac1 activity during cell migration. *J Cell Biol.* 168:813-824.
- Pugacheva, E.N., and E.A. Golemis. 2005. The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat Cell Biol.* 7:937-946.
- Pugacheva, E.N., and E.A. Golemis. 2006. HEF1-aurora A interactions: points of dialog between the cell cycle and cell attachment signaling networks. *Cell Cycle.* 5:384-391.
- Pylayeva, Y., K.M. Gillen, W. Gerald, H.E. Beggs, L.F. Reichardt, and F.G. Giancotti. 2009. Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest.* 119:252-266.
- Quilliam, L.A., Q.T. Lambert, L.A. Mickelson-Young, J.K. Westwick, A.B. Sparks, B.K. Kay, N.A. Jenkins, D.J. Gilbert, N.G. Copeland, and C.J. Der. 1996. Isolation of a NCK-associated kinase, PRK2, an SH3-binding protein and potential effector of Rho protein signaling. *J Biol Chem.* 271:28772-28776.
- Regelmann, A.G., N.M. Danzl, C. Wanjalla, and K. Alexandropoulos. 2006. The hematopoietic isoform of Cas-Hef1-associated signal transducer regulates chemokine-induced inside-out signaling and T cell trafficking. *Immunity.* 25:907-918.
- Reynolds, A.B., S.B. Kanner, H.C. Wang, and J.T. Parsons. 1989. Stable association of activated pp60src with two tyrosine-phosphorylated cellular proteins. *Mol Cell Biol.* 9:3951-3958.
- Riggins, R.B., R.M. DeBerry, M.D. Toosarvandani, and A.H. Bouton. 2003a. Src-dependent association of Cas and p85 phosphatidylinositol 3'-kinase in v-crk-transformed cells. *Mol Cancer Res.* 1:428-437.
- Riggins, R.B., L.A. Quilliam, and A.H. Bouton. 2003b. Synergistic promotion of c-Src activation and cell migration by Cas and AND-34/BCAR3. *J Biol Chem.* 278:28264-28273.
- Riggins, R.B., K.S. Thomas, H.Q. Ta, J. Wen, R.J. Davis, N.R. Schuh, S.S. Donelan, K.A. Owen, M.A. Gibson, M.A. Shupnik, C.M. Silva, S.J. Parsons, R. Clarke, and A.H. Bouton. 2006. Physical and functional interactions between Cas and c-Src induce tamoxifen resistance of breast cancer cells through pathways involving epidermal growth factor receptor and signal transducer and activator of transcription 5b. *Cancer Res.* 66:7007-7015.
- Ring, A., and M. Dowsett. 2004. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-related cancer.* 11:643-658.
- Roselli, S., Y. Wallez, L. Wang, V. Vervoort, and E.B. Pasquale. 2010. The SH2 domain protein Shep1 regulates the in vivo signaling function of the scaffolding protein Cas. *Cell Signal.* 22:1745-1752.
- Ruest, P.J., N.Y. Shin, T.R. Polte, X. Zhang, and S.K. Hanks. 2001. Mechanisms of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation by FAK and Src. *Mol Cell Biol.* 21:7641-7652.
- Sakai, R., A. Iwamatsu, N. Hirano, S. Ogawa, T. Tanaka, H. Mano, Y. Yazaki, and H. Hirai. 1994. A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO J.* 13:3748-3756.
- Sakakibara, A., Y. Ohba, K. Kurokawa, M. Matsuda, and S. Hattori. 2002. Novel function

- of Chat in controlling cell adhesion via Cas-Crk-C3G-pathway-mediated Rap1 activation. *J Cell Sci.* 115:4915-4924.
- Salgia, R., E. Pisick, M. Sattler, J.L. Li, N. Uemura, W.K. Wong, S.A. Burky, H. Hirai, L.B. Chen, and J.D. Griffin. 1996. p130CAS forms a signaling complex with the adapter protein CRKL in hematopoietic cells transformed by the BCR/ABL oncogene. *J Biol Chem.* 271:25198-25203.
- Sawada, Y., M. Tamada, B.J. Dubin-Thaler, O. Cherniavskaya, R. Sakai, S. Tanaka, and M.P. Sheetz. 2006. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell.* 127:1015-1026.
- Shen, T.L., and J.L. Guan. 2001. Differential regulation of cell migration and cell cycle progression by FAK complexes with Src, PI3K, Grb7 and Grb2 in focal contacts. *FEBS Lett.* 499:176-181.
- Shibata, H., K. Oishi, A. Yamagiwa, M. Matsumoto, H. Mukai, and Y. Ono. 2001. PKNbeta interacts with the SH3 domains of Graf and a novel Graf related protein, Graf2, which are GTPase activating proteins for Rho family. *J Biochem.* 130:23-31.
- Schlaepfer, D.D., M.A. Broome, and T. Hunter. 1997. Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol Cell Biol.* 17:1702-1713.
- Schobert, B., and H. Tschesche. 1978. Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Biochim Biophys Acta.* 541:270-277.
- Schrecengost, R.S., R.B. Riggins, K.S. Thomas, M.S. Guerrero, and A.H. Bouton. 2007. Breast cancer antiestrogen resistance-3 expression regulates breast cancer cell migration through promotion of p130Cas membrane localization and membrane ruffling. *Cancer Res.* 67:6174-6182.
- Schuh, N.R., M.S. Guerrero, R.S. Schrecengost, and A.H. Bouton. 2010. BCAR3 regulates Src/p130 Cas association, Src kinase activity, and breast cancer adhesion signaling. *J Biol Chem.* 285:2309-2317.
- Sieg, D.J., D. Ilic, K.C. Jones, C.H. Damsky, T. Hunter, and D.D. Schlaepfer. 1998. Pyk2 and Src-family protein-tyrosine kinases compensate for the loss of FAK in fibronectin-stimulated signaling events but Pyk2 does not fully function to enhance FAK- cell migration. *EMBO J.* 17:5933-5947.
- Siu, M.K., C.H. Wong, W. Xia, D.D. Mruk, W.M. Lee, and C.Y. Cheng. 2011. The beta1-integrin-p-FAK-p130Cas-DOCK180-RhoA-vinculin is a novel regulatory protein complex at the apical ectoplasmic specialization in adult rat testes. *Spermatogenesis.* 1:73-86.
- Soni, S., B.T. Lin, A. August, R.I. Nicholson, and K.H. Kirsch. 2009. Expression of a phosphorylated p130(Cas) substrate domain attenuates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt survival pathway in tamoxifen resistant breast cancer cells. *J Cell Biochem.* 107:364-375.
- Sorokin, A., and E. Reed. 1998. Insulin stimulates the tyrosine dephosphorylation of docking protein p130cas (Crk-associated substrate), promoting the switch of the adaptor protein crk from p130cas to newly phosphorylated insulin receptor substrate-1. *Biochem J.* 334 (Pt 3):595-600.
- Sparks, A.B., L.A. Quilliam, J.M. Thorn, C.J. Der, and B.K. Kay. 1994. Identification and characterization of Src SH3 ligands from Phage-displayed random peptide libraries. *J. Biol. Chem.* 269:23853-23856.
- Suzuki, T., T. Nakamoto, S. Ogawa, S. Seo, T. Matsumura, K. Tachibana, C. Morimoto, and H. Hirai. 2002. MICAL, a novel CasL interacting molecule, associates with vimentin. *J Biol Chem.* 277:14933-14941.
- Sztacho, M. 2009. Funkční význam fosforylace tyrozínových zbytků v SH3 doméně. *PřF*

- Tachibana, K., T. Urano, H. Fujita, Y. Ohashi, K. Kamiguchi, S. Iwata, H. Hirai, and C. Morimoto. 1997. Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates by focal adhesion kinase. A putative mechanism for the integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates. *J Biol Chem.* 272:29083-29090.
- Takino, T., M. Tamura, H. Miyamori, M. Araki, K. Matsumoto, H. Sato, and K.M. Yamada. 2003. Tyrosine phosphorylation of the CrkII adaptor protein modulates cell migration. *J Cell Sci.* 116:3145-3155.
- Tatárová, Z. 2012. Adaptor domains in signalling proteins: phosphorylation analysis and a role in mechanosensing. *PřF UK v Praze*. Diplomová práce.
- Tatarova, Z., J. Brabek, R. D., and M. Novotny. SH3 domain tyrosine phosphorylation – sites, role and evolution (in press). *PLoS One*.
- Tazaki, T., K. Miyazaki, E. Hiyama, T. Nakamoto, R. Sakai, N. Yamasaki, Z. Honda, M. Noda, N. Miyasaka, T. Sueda, and H. Honda. 2008. Functional analysis of Src homology 3-encoding exon (exon 2) of p130Cas in primary fibroblasts derived from exon 2-specific knockout mice. *Genes Cells.* 13:145-157.
- Tazaki, T., T. Sasaki, K. Uto, N. Yamasaki, S. Tashiro, R. Sakai, M. Tanaka, H. Oda, Z. Honda, and H. Honda. 2010. p130Cas, Crk-associated substrate plays essential roles in liver development by regulating sinusoidal endothelial cell fenestration. *Hepatology.* 52:1089-1099.
- Tikhmyanova, N., J.L. Little, and E.A. Golemis. 2010. CAS proteins in normal and pathological cell growth control. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 67:1025-1048.
- Tornillo, G., B. Bisaro, M.D. Camacho-Leal, M. Galie, P. Provero, P. Di Stefano, E. Turco, P. Defilippi, and S. Cabodi. 2010. p130Cas promotes invasiveness of three-dimensional ErbB2-transformed mammary acinar structures by enhanced activation of mTOR/p70S6K and Rac1. *Eur J Cell Biol.*
- Tran, T., S. Hoffmann, K. Wiesehan, E. Jonas, C. Luge, A. Aladag, and D. Willbold. 2005. Insights into human Lck SH3 domain binding specificity: different binding modes of artificial and native ligands. *Biochemistry.* 44:15042-15052.
- Tsuda, M., S. Tanaka, H. Sawa, H. Hanafusa, and K. Nagashima. 2002. Signaling adaptor protein v-Crk activates Rho and regulates cell motility in 3Y1 rat fibroblast cell line. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research.* 13:131-139.
- Tzivion, G., V.S. Gupta, L. Kaplun, and V. Balan. 2006. 14-3-3 proteins as potential oncogenes. *Seminars in cancer biology.* 16:203-213.
- Unsal-Kacmaz, K., S. Ragunathan, E. Rosfjord, S. Dann, E. Upeslakis, M. Grillo, R. Hernandez, F. Mack, and A. Klippel. 2011. The interaction of PKN3 with RhoC promotes malignant growth. *Mol Oncol.*
- van Agthoven, T., T.L. van Agthoven, A. Dekker, P.J. van der Spek, L. Vreede, and L.C. Dorssers. 1998. Identification of BCAR3 by a random search for genes involved in antiestrogen resistance of human breast cancer cells. *EMBO J.* 17:2799-2808.
- Vanden Borre, P., R.I. Near, A. Makkinje, G. Mostoslavsky, and A. Lerner. 2011. BCAR3/AND-34 can signal independent of complex formation with CAS family members or the presence of p130Cas. *Cell Signal.* 23:1030-1040.
- Vincent, S., and J. Settleman. 1997. The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Mol Cell Biol.* 17:2247-2256.
- Vuori, K., H. Hirai, S. Aizawa, and E. Ruoslahti. 1996. Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family

- kinases. *Mol Cell Biol.* 16:2606-2613.
- Wendt, M.K., J.A. Smith, and W.P. Schiemann. 2009. p130Cas is required for mammary tumor growth and transforming growth factor-beta-mediated metastasis through regulation of Smad2/3 activity. *J Biol Chem.* 284:34145-34156.
- Wisniewska, M., B. Bossenmaier, G. Georges, F. Hesse, M. Dangel, K.P. Kunkele, I. Ioannidis, R. Huber, and R.A. Engh. 2005. The 1.1 angstrom resolution crystal structure of the p130cas SH3 domain and ramifications for ligand selectivity. *J. Mol. Biol.* 347:1005-1014.
- Yajnik, V., C. Paulding, R. Sordella, A.I. McClatchey, M. Saito, D.C. Wahrer, P. Reynolds, D.W. Bell, R. Lake, S. van den Heuvel, J. Settleman, and D.A. Haber. 2003. DOCK4, a GTPase activator, is disrupted during tumorigenesis. *Cell.* 112:673-684.
- Yamakita, Y., G. Totsukawa, S. Yamashiro, D. Fry, X. Zhang, S.K. Hanks, and F. Matsumura. 1999. Dissociation of FAK/p130(CAS)/c-Src complex during mitosis: role of mitosis-specific serine phosphorylation of FAK. *J Cell Biol.* 144:315-324.
- Yi, J., S. Kloeker, C.C. Jensen, S. Bockholt, H. Honda, H. Hirai, and M.C. Beckerle. 2002. Members of the Zyxin family of LIM proteins interact with members of the p130Cas family of signal transducers. *J Biol Chem.* 277:9580-9589.
- Yokoyama, N., J. Lougheed, and W.T. Miller. 2005. Phosphorylation of WASP by the Cdc42-associated kinase ACK1: dual hydroxyamino acid specificity in a tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 280:42219-42226.
- Yokoyama, N., and W.T. Miller. 2001. Protein phosphatase 2A interacts with the Src kinase substrate p130(CAS). *Oncogene.* 20:6057-6065.
- Yu, H., J.K. Chen, S. Feng, D.C. Dalgarno, A.W. Brauer, and S.L. Schreiber. 1994. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell.* 76:933-945.
- Yu, H., M.K. Rosen, and S.L. Schreiber. 1993. ¹H and ¹⁵N assignments and secondary structure of the Src SH3 domain. *FEBS Lett.* 324:87-92.
- Zucchini, D., G. Caprini, R.J. Pasterkamp, G. Tedeschi, and M.A. Vanoni. 2011. Kinetic and spectroscopic characterization of the putative monooxygenase domain of human MICAL-1. *Arch Biochem Biophys.* 515:1-13.